



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

### TRABAJO FINAL DE GRADO

---

# INTERACCIÓN DE LA CATEQUINA Y DEL ÁCIDO CAFEICO CON LA RODOPSINA

**Laura Garcia Perez**

Margarita Morillo Cazorla y Pere Garriga Solé

Ingeniería Química

23-06-2015

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, 2015. Todos los derechos reservados



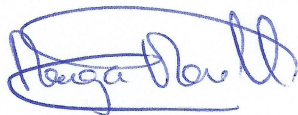
## GRAU EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

Els senyors Margarita Morillo Cazorla i Pere Garriga i Solé, com a directors del treball

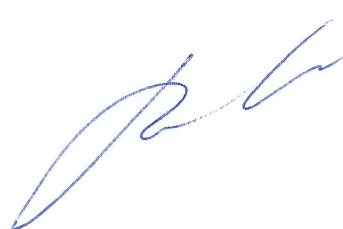
### CERTIFIQUEN

Que la Sra. Laura Garcia Perez ha realitzat sota la nostra supervisió el treball *Interacción de la catequina y del ácido cafeico con la rodopsina* que es recull en aquesta memòria per optar al títol de grau en Òptica i Optometria.

I per a què consti, signem aquest certificat.



Sra...Margarita Morillo Cazorla.....  
Directora del treball



Sr.Pere Garriga i Solé....  
Director del treball

Terrassa, ....4..... de .....juny..... de 2015.....



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

# Interacción de la catequina y del ácido cafeico con la rodopsina

## RESUMEN

En este proyecto se ha estudiado la posible interacción de la rodopsina con dos compuestos fenólicos: un flavonoide, la catequina y un ácido fenólico, el ácido cafeico. Los fenoles y flavonoides son sustancias que se encuentran en alimentos de nuestra dieta diaria como las frutas y las verduras. Proporcionan colores a las plantas y las protegen de los rayos UV. Tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, y antifúngicas que los hacen beneficiosos para nuestra salud, pudiendo prevenir enfermedades degenerativas y trastornos de la edad, así como también inhibir el crecimiento de células cancerígenas, entre otros efectos. Respecto a la salud ocular, la catequina podría prevenir la formación de cataratas, protegiendo al cristalino de los rayos UV, y por otro lado la actividad antiangiogénica del ácido cafeico podría proteger frente a patologías retinianas como la DMAE y la retinopatía diabética. En este estudio se han utilizado muestras de rodopsina solubilizada, extraída de retinas bovinas, hidrato de catequina y ácido cafeico para realizar experimentos *in vitro* de estabilidad térmica y de regeneración del pigmento visual rodopsina. Mediante espectrofotometría de absorción UV-visible se ha podido determinar que el ácido cafeico puede aumentar la estabilidad de la rodopsina, y tanto la catequina como el ácido cafeico mejorarían la regeneración de la rodopsina a partir de opsina y retinal. Estos resultados sugieren un papel beneficioso de estos compuestos a nivel molecular de las células fotorreceptoras. Se requerirían estudios adicionales para confirmar estos efectos, y su posible extrapolación *in vivo*.



## GRAU EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

# Interacció de la catequina i de l'àcid cafeic amb la rodopsina

## RESUM

En aquest projecte, s'ha estudiat la possible interacció de la rodopsina amb dos compostos fenòlics: un flavonoide, la catequina i un àcid fenòlic, l'àcid cafeic. Els fenols i flavonoides són substàncies que es troben en aliments de la nostra dieta diària com les fruites i les verdures. Proporcionen colors a les plantes i les protegeixen dels raigs UV. Tenen propietats antioxidants, antiinflamatòries, antivirals, i antifúngiques que els fan beneficiosos per a la nostra salut, prevenint malalties degeneratives i trastorns de l'edat, així com també inhibir el creixement de cèl·lules cancerígenes, entre d'altres efectes. Respecte a la salut ocular, la catequina podria prevenir la formació de cataractes, protegint al cristal·lí del raig UV, i per un altre banda l'activitat antiangiogènica de l'àcid cafeic podria protegir en front a patologies retinianes com la DMAE i la retinopatia diabètica. En aquest estudi s'han utilitzat mostres de rodopsina solubilitzada, extreta de retines bovines, hidrat de catequina i àcid cafeic per realitzar experiments *in vitro* d'estabilitat tèrmica i de regeneració del pigment visual rodopsina. Mitjançant espectrofotometria d'absorció UV-visible s'ha pogut determinar que l'àcid cafeic pot augmentar l'estabilitat de la rodopsina, i tant la catequina com l'àcid cafeic millorarien la regeneració de la rodopsina a partir d'opsina i retinal. Aquests resultats suggereixen un paper beneficiós d'aquests compostos a nivell molecular de les cèl·lules fotoreceptores. Es requeririen estudis addicionals per confirmar aquests efectes, i la seva possible extrapolació *in vivo*.





## BACHELOR'S DEGREE IN OPTICS AND OPTOMETRY

# Interaction of catechin and caffeic acid with rhodopsin

### ABSTRACT

In this project we have studied the possible interaction of rhodopsin with two phenolic compounds: a flavonoid such as catechin and a phenolic derivative like caffeic acid. Phenols and flavonoids are found in foods really common in our daily diet like fruits and vegetables. They provide color to plants and protect them from UV rays at the same time. Flavonoids are known to have antioxidant, anti-inflammatory, antifungal and antiviral properties, which make them beneficial to human health. Phenolic compounds are associated with a reduced risk of major age-related diseases, as well as inhibition of the growth of cancer cells, among other effects. In visual health, catechin could prevent the formation of cataracts protecting the crystallin lens against UV rays. On the other side, the antiangiogenic activity of caffeic acid could protect us against retinal diseases like AMD and diabetic retinopathy. In this study, we used solubilized rhodopsin samples extracted from bovine retinas, catechin and caffeic acid to perform *in vitro* experiments on the thermal stability and regeneration of the rhodopsin visual pigment. By means of UV-visible absorption spectrophotometry it has been found that caffeic acid can increase the stability of rhodopsin, and both catechin and caffeic acid would improve the regeneration of rhodopsin from opsin and retinal. These results suggest a beneficial role of these compounds at the molecular level of the photoreceptor cells. Additional studies are needed to confirm these effects, and their possible *in vivo* extrapolation.

# INTERACTION OF CATECHIN AND CAFFEIC ACID WITH RHODOPSIN

## SUMMARY

Phenolic compounds can range from the simplest, such as hydroxylated derivatives of benzoic and cinnamic acids, to the most complex such as polyphenols or flavonoids. Phenolics compounds are present in plants and food products we consume daily such as fruits and vegetables, olive oil, cocoa, spices, drinks like green tea, wine and others. The most common phenols in plants and foods in our diet are phenolic acids, flavonoids and flavonols; like caffeic acid, catechin and rutin respectively. Phenols tend to have a favorable impact on the quality of food due to its antioxidant properties that help with the conservation of polyunsaturated lipids, and can also serve as natural colorants, among other properties.

Phenols can be classified into two groups: flavonoids, which consists of two benzene rings connected by a chain of three carbon atoms, and non flavonoids lacking such structure. On one hand, the flavonoids can be divided into flavonols, flavonones, flavanones, flavones, flavanols, and anthocyanins. Catechin is an example of flavonoid. On the other hand, non flavonoids consist of the three following subgroups: phenolic acids, non carboxylic phenols and stilbenes. Caffeic acid is an example of phenolic acid.

Flavonoids play an important role in the functions of plants. One of the important functions of these substances is to provide color to plants and to protect them against UV radiation. They have the ability to absorb ultraviolet radiation because of their specific chemical structure, thus participating in photosynthesis. This variety of colors can attract insects for pollination of flowers. They constitute a chemical mechanism for plant defense because they increase the resistance of some plants against plant diseases and infections from insects and microorganisms. Furthermore, they can also inhibit some plant hormones acting as plant growth regulators.

These natural compounds are considered beneficial to our health, because they have antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, antiangiogenic and anti-fungal properties. So the regular consumption of foods containing phenols is associated with a decreased risk of developing a number of diseases and disorders associated with aging such as cardiovascular, neurodegenerative and ocular pathologies, besides potentially inhibiting the growth of cancer cells.

The antioxidant activity of flavonoids is due to the chemical structure of these compounds. It is enhanced when positions 3' and 4' of the B ring are hydroxylated and this effect is strengthened by the presence of a double bond between carbons 2 and 3, by a free OH group at position 3 or a carbonyl group at position 4. Quercetin is an example of such type of chemical structure. Another mechanism that is the reason why flavonoids have antioxidant activity is the inhibition of oxidases and the elimination of free radicals.

Flavonoids may have both effects as antioxidant or prooxidant, depending on the experimental conditions: the effective concentration at the place where reactive oxygen species (ROS) are formed; the stability of the flavonoid radical formed to yield an attacking hydrogen atom radical, the lipophilicity of the membrane, and the pH.

Catechin is a polyphenolic flavonoid, found mainly in green tea. It has the biological activities of flavonoids described above, which can protect the crystallin lens from ultraviolet radiation (UV) and prevent cataract formation at the same time. Catechin is one of the flavonoids that can protect retinal tissue peroxidation of lipids and protein damage induced by glutamate.

Caffeic acid is a phenol, which can be found in greater proportion in coffee. The main property of this compound is its antiangiogenic potential that can be used to treat retinal diseases such as age-related macular degeneration (AMD). The antiangiogenic property of caffeic acid inhibits the proliferation and migration of endothelial cells in the retina induced by vascular endothelial growth and neovascularization, and this activity is associated with its antioxidant activity.

Rhodopsin is a visual pigment found in the membranes of the outer segment discs of rod photoreceptor cells. It is an integral membrane glycoprotein that is part of a superfamily of proteins known as G-protein coupled receptors. Rhodopsin absorbs light maximally at the wavelength of 500 nm (yellow) and transmits red and violet so it has a purple appearance. Rhodopsin is composed of a transmembrane protein called opsin located in the photoreceptor discs membranes. It is covalently linked to a chromophore, a derivative of vitamin A, 11-*cis*-retinal. Opsin is a polypeptide chain consisting of 348 amino acids. It comprises three structurally distinct domains:

- the cytoplasmic domain, which corresponds to the C-terminal and is where the G protein binds to produce the light signal transduction in the visual process.
- the transmembrane domain consisting of 7 transmembrane  $\alpha$ -helices that perpendicularly cross the disc membrane. Their interactions with the hydrophobic membrane discs components of the rods produce a barrel-shaped arrangement with 11-*cis*-retinal being on the inside (unstable configuration). Upon light absorption 11-*cis*-retinal isomerizes to all-*trans*-retinal (more stable configuration) activating rhodopsin and thus initiating the process of vision.
- the extracellular domain corresponding to the N-terminal region. This controls the folding and structural stability of rhodopsin.

The objective of this project was to study whether catechin and caffeic acid affected the structure, stability and function of rhodopsin and how they did it. This objective was carried out by performing *in vitro* tests of thermal stability, regeneration and acidification by the experimental technique of UV-visible spectrophotometry.

UV-visible spectrophotometry, allows us to the interaction of light with our sample over a wavelength range. This interaction and the resulting spectra will depend on the structure of the protein, the presence of the small ligand molecules investigate, and the environmental conditions like temperature. A double-beam spectrophotometer, connected to a Peltier temperature control unit, was used throughout the experimental development.

In thermal stability experiments, rhodopsin decreases its absorbance at 500 nm with time and measuring the decrease rate provides a measure of the stability of the protein at a given temperature. We wanted to know if catechin, or caffeic acid, could help stabilize the protein and that this could be followed by a slower decrease of the absorbance band at 500 nm in the presence of any of these compounds.

In the case of the rhodopsin regeneration assays with 9-*cis*-retinal, our aim was to find out if catechin, or caffeic acid, could improve rhodopsin regeneration.

For acidification experiments, the rhodopsin sample is initially illuminated and subsequently acidified with sulfuric acid at room temperature. Acidification results in a shift in the visible absorbance band from 500 nm to 440 nm that reflects Schiff base reprotonation of the acid denatured protein. Thus, the presence of a band at 440 nm after acidification confirms that the retinal was still covalently linked to the opsin apoprotein.

The results obtained in this study show that rhodopsin in the presence of a phenolic acid such as caffeic acid, improves its thermal stability, delaying protein denaturation at high temperatures. Our results can be interpreted as reflecting an stabilizing effect of caffeic acid upon binding to rhodopsin. Furthermore, the presence of a flavonoid such as catechin appears to enhance rhodopsin regeneration after illumination. However, the kinetics of the regeneration process seems to be slowed down in the presence of catechin.

In addition, an unexpected unusual behavior of the compounds at high temperature has been observed which can be compatible with auto-oxidation of catechin and caffeic acid.

In the experiments of thermal stability, rhodopsin thermal decay in the presence of 2,5  $\mu$ M AC was increased to  $36 \pm 8$  min from the  $31 \pm 7$  min in the absence of the compound. We can conclude that when rhodopsin interacts with caffeic acid, it helps maintaining its structure for a longer time, as we can see from the slower absorbance decrease at 500 nm. On the other hand, when rhodopsin is in the presence of catechin, the process is faster so that this compound that does seem to show the same stabilizing effect than AC, and the structural stability of rhodopsin is not preserved in this case.

In the regeneration assays, rhodopsin was regenerated with 9-*cis*-retinal to a 66,60% with  $t_{1/2}$  of  $7,4 \pm 2$  min for the process. In the presence of 2,5  $\mu$ M CH it reached 100% regeneration and the  $t_{1/2}$  was increased to  $11,5 \pm 3$  min. Finally, the regeneration was 97,5%, and  $t_{1/2}$  was  $11,4 \pm 2$  min, in the presence of 2,5  $\mu$ M AC. Clearly, the phenolic compounds studied, catechin and caffeic acid, can play an important role in the complete regeneration of rhodopsin. It is interesting to note that although they both favored complete rhodopsin regeneration, they did it in a slower fashion. This effect may be related to the specific nature of the compound-rhodopsin interaction affecting the Metall decay process and the regeneration kinetics.

In conclusion, catechin hydrate and caffeic acid have been shown to improve rhodopsin regeneration, although the process is slower than when rhodopsin is in the absence of these compounds. The thermal stability of rhodopsin, at 55°C, in the presence of CH decreases, but significantly increases in the presence of AC. Therefore, these compounds may be included in our daily diet, as preventive elements against possible retinal diseases that may develop in the future. They could potentially be used therapeutically for future treatments of retinal pathologies such as AMD or night blindness, although there is still much study and research to be done in this field. Additional studies are needed to confirm these effects, and their possible *in vivo* extrapolation.



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a los directores del trabajo, en primer lugar a Margarita Morillo Cazorla, que sin ella no hubiera sido posible la realización de éste proyecto. Gracias Marga por ayudarme en todo momento, por tener tanta paciencia y estar detrás de mí siempre y preocupándose por el trabajo, por ser tan eficaz contestando a todos mis correos y dudas (que eso no lo hace cualquier director/a). También agradecer a Pere Garriga Sole, por sus consejos para realizar un buen trabajo, y por iluminarnos cuando los resultados que obteníamos no tenían sentido y no lográbamos encontrar el porqué. Y a M<sup>a</sup> Guadalupe Herrera Hernández por proporcionarnos la catequina y el ácido cafeico para realizar éste estudio.

Y por supuesto agradecer a mi familia el apoyo y los ánimos que me han dado para iniciar y finalizar este proyecto.

## Sumario

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
1.1. Compuestos fenólicos	15
1.2. Flavonoides	16
1.2.1. Propiedades Químicas	16
1.2.2. Distribución	17
1.2.3. Propiedades Físicas	18
1.2.4. Propiedades Biológicas	18
1.2.5. Funciones	19
1.3. Catequina	20
1.4. Ácido Cafeico	20
1.5. Rodopsina	21
1.5.1. Fotoactivación y Regeneración de la rodopsina	22
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
3.1. Reactivos y materiales	24
3.2.1. Solubilización de rodopsina en presencia de detergente DM	25
3.2.2. Preparación del tampón HEPES 1M	25
3.2.3. Preparación del tampón HEPES 100 mM 0,05%DM	25
3.2.4. Espectrofotometría UV-visible	25
3.2.4.1. Estabilidad térmica de la rodopsina en presencia y ausencia de CH	27
3.2.4.1.1. Hidrato de Catequina a 20 y 55°C	27
3.2.4.1.2. EtOH y DMSO en HEPES a 20°C	27
3.2.4.1.3. Preparación de las disoluciones de CH	28
3.2.4.1.4. Estabilidad térmica de la rodopsina a 55°C	28
3.2.4.1.5. Estabilidad térmica de la rodopsina con CH 2,51 mM a 55°C	29
3.2.4.1.6. Estabilidad térmica de la rodopsina con CH 5,02 mM a 55°C	29
3.2.4.1.7. Estabilidad térmica de la rodopsina con CH 2,52 µM a 55°C	30
3.2.4.2. Estabilidad térmica de la rodopsina en presencia y ausencia de AC	30
3.2.4.2.1. Preparación de las disoluciones de AC	30
3.2.4.2.2. Estabilidad térmica de la rodopsina a 55°C	31
3.2.4.2.3. Estabilidad térmica de la rodopsina con AC 2,5 µM a 55°C	31

3.2.4.3. Regeneración .....	32
3.2.4.3.1. Regeneración de la rodopsina con 9- <i>cis</i> -retinal a 20°C .....	32
3.2.4.3.2. Interacción entre 9- <i>cis</i> -retinal y CH o AC a 20°C .....	32
3.2.4.3.3. Regeneración de la rodopsina en presencia de CH a 20°C .....	33
3.2.4.3.4. Regeneración de la rodopsina en presencia de AC a 20°C .....	33
3.2.4.4. Comportamiento al acidificar .....	34
3.2.4.4.1. Acidificación de la rodopsina .....	34
3.2.4.4.2. Acidificación de la rodopsina + CH .....	35
3.2.4.4.3. Acidificación de la rodopsina + AC .....	35
3.2.4.5. Reacciones de primer orden. Cálculo del tiempo de vida media .....	36
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
4.1. Estabilidad térmica .....	37
4.1.1. Estudio del comportamiento de la rodopsina a 55°C .....	37
4.1.2. Estabilidad térmica del CH .....	38
4.1.3. Estabilidad térmica de la rodopsina en presencia de CH .....	40
4.1.4. Estabilidad térmica del AC .....	41
4.1.5. Estabilidad térmica de la rodopsina en presencia de AC .....	42
4.2. Regeneración .....	43
4.2.1. Regeneración de la rodopsina con 9- <i>cis</i> -retinal .....	43
4.2.2. Interacción entre CH y 9- <i>cis</i> -retinal .....	45
4.2.3. Regeneración de la rodopsina con 9- <i>cis</i> -retinal en presencia de CH .....	46
4.2.4. Interacción entre AC y 9- <i>cis</i> -retinal .....	47
4.2.5. Regeneración de la rodopsina con 9- <i>cis</i> -retinal en presencia de AC .....	48
4.3. Acidificación .....	49
4.3.1. Acidificación de rodopsina .....	49
4.3.2. Acidificación de rodopsina en presencia CH .....	50
4.3.3. Acidificación de rodopsina en presencia AC .....	51
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>53</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>55</b>
7.1. Anexo1: CH 2,5 mM y 2,5 µM diluida en tres soluciones: HEPES, EtOH y DMSO .....	55
7.2. Anexo2: AC diluido en EtOH y DMSO a diferentes concentraciones .....	57
<b>8. COMPROMISO ÉTICO Y SOCIAL .....</b>	<b>58</b>

## Índice de Figuras

### 1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. A la izquierda: estructura química de los compuestos fenólicos. A la derecha: estructura química del ácido gálico, que es un tipo de ácido fenólico .....	15
Figura 1. 2. Estructura básica de los flavonoides .....	16
Figura 1.3. Estructura química de uno de los flavonoides más comunes. Color rojo, estructura básica de los flavonoides .....	16
Figura 1.4. Estructura química de las clases de flavonoides: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanosoles y antocianinas .....	17
Figura 1.5. Estructura química de las clases de flavonoides: catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonas, pterocarpanos y rotenoides .....	17
Figura 1.6. Estructura química de la quercetina .....	18
Figura 1. 7. Estructura molecular de la catequina .....	20
Figura 1. 8. Estructura molecular del ácido cafeico .....	20
Figura 1.9. Estructura de la rodopsina .....	21
Figura 1.10. La rodopsina contiene en su estructura el retinal. Al ser absorbidos los fotones inducen un cambio del retinal convirtiéndolo de la forma 11- <i>cis</i> -retinal a la forma todo- <i>trans</i> -retinal .....	22

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1. Funcionamiento del espectrofotómetro .....	26
Figura 3.2. Representación gráfica de la absorbancia de la rodopsina a 500 nm y del 9- <i>cis</i> -retinal a 373 nm .....	26
Figura 3.3. Acidificación de una muestra de rodopsina tras iluminar con lámpara FIBER-LITE MI-150 a través de un filtro $\lambda > 495$ nm. ....	34

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 4.1. Espectro de absorción UV-visible de la Rodopsina solubilizada en HEPES 100 mM pH 7,4 (0,05%DM) a T55°C., se realizaron 60 ciclos y se registró un espectro cada minuto .....	37
Figura 4.2. Gráfica de $A_{500}$ media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de tres muestras .....	37

Figura 4.3. a) Comportamiento de la rodopsina solubilizada en ausencia y en presencia de CH a diferentes concentraciones (2,5 mM, 5 mM) en HEPES 100 mM (conteniendo 0,05%DM) b) Espectro de la rodopsina solubilizada y de la CH a una concentración de 2,52 mM .....	38
Figura 4.4. Espectros de absorción UV-visible de la CH a 55°C, se registraron los espectros durante 1 h cada minuto. a) [CH]= 2,5 mM b) [CH]= 0,25 mM .....	38
Figura 4.5. Espectros de absorción UV-visible de la CH ([CH]=2,5 mM) disuelto en a) HEPES, EtOH y DMSO T20°C b) en HEPES T55°C a diferentes tiempos, se registraron 60 espectros durante 1 h, uno cada minuto. ....	39
Figura 4.6. Espectro de absorción UV-visible a 55°C a) CH diluido en HEPES, EtOH y DMSO T20°C b) CH/HEPES T55°C. La [CH] fue 2,5 µM. Los experimentos se dejaron 1 h y se registró 1 espectro cada 5 min .....	39
Figura 4.7. Espectro de absorción UV-visible a 55°C. Rodopsina solubilizada y CH. a) [CH]= 2,5 mM b) [CH]= 2,5 µM .....	40
Figura 4.8. Gráfica de $A_{500}$ media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de tres muestras. a)[CH]= 2,5 mM. b) [CH]= 2,5 µM .....	40
Figura 4.9. Espectros de absorción UV-visible del AC a 20°C y 55°C, se registraron espectros durante 1 h cada 5 minutos. a) [AC]=25 mM, 2,5 mM, 0,25 mM, 2,5 µM a 20°C b) [AC]= 2,5 µM a 55°C.....	41
Figura 4.10. Espectro de absorción UV-visible a 55°C. Rodopsina solubilizada y AC.[AC] = 2,5 µM.....	42
Figura 4.11. Gráfica de $A_{500}$ media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de cinco muestras.....	42
Figura 4.12. Espectro de absorción UV-visible a 20°C. a) Rodopsina solubilizada, 9- <i>cis</i> -retinal, y rodopsina iluminada b) rodopsina solubilizada regenerada con 9- <i>cis</i> -retinal. Se realizaron espectros cada 5 minutos durante 2 h. ....	43
Figura 4.13. Gráfica de $A_{500}$ media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de tres muestras .....	43
Figura 4.14. Espectro de absorción UV-visible a 20°C. a) Espectro CH/HEPES 2,5 µM b) Espectro 9- <i>cis</i> -retinal c) Espectro CH+9- <i>cis</i> -retinal a diferentes tiempos .....	45
Figura 4.15. Espectro de absorción UV-visible a 20°C. a) Rodopsina con CH, rodopsina con CH y 9- <i>cis</i> -retinal, y rodopsina con CH y 9- <i>cis</i> -retinal iluminada b) Regeneración de la rodopsina con 9- <i>cis</i> -retinal en presencia de CH. [CH]= 2,5 µM. Se realizaron espectros cada 5 min. ....	46
Figura 4.16. Gráfica de $A_{500}$ media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de tres muestras .....	46
Figura 4.17. Espectro de absorción UV-visible a 20°C. a) Espectro AC/HEPES 2,5 µM b) Espectro 9- <i>cis</i> -retinal c) Espectro AC+9- <i>cis</i> -retinal a diferentes tiempos .....	47



Figura 4.18. Espectro de absorción UV-visible a 20°C. a) Rodopsina con AC, rodopsina con AC y 9- <i>cis</i> -retinal, y rodopsina con AC y 9- <i>cis</i> -retinal iluminada b) Regeneración de la rodopsina con 9- <i>cis</i> -retinal en presencia de AC, [AC]= 2,5 µM. Se realizaron espectros cada 5 min. ....	48
Figura 4.19. Gráfica de A <sub>500</sub> media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de tres muestras .....	48
Figura 4.20. a) Espectro rodopsina solubilizada y posteriormente iluminada con filtro amarillo b) acidificación de la rodopsina con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N a diferentes tiempos .....	49
Figura 4.21. a) Espectro rodopsina solubilizada con [CH]= 2,5 µM y posteriormente iluminada con filtro amarillo b) Acidificación de la rodopsina en presencia de [CH]= 2,5 µM con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N. Se realizó espectro inicial y a los 5 min. ....	50
Figura 4.22. a) Espectro rodopsina solubilizada con [AC]= 2,5 µM y posteriormente iluminada con filtro amarillo λ>495nm b) Acidificación de la rodopsina en presencia de [AC]= 2,5 µM con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N. Se realizó espectro inicial y a los 5 min. ....	51
Tabla 4.1. Resultados obtenidos del t <sub>1/2</sub> de la rodopsina sola y de la rodopsina en presencia de CH a concentraciones de 2,5 mM y 2,5 µM. En la última fila se muestra la media y el error de las tres muestras. ....	40
Tabla 4. 2. Resultados obtenidos del t <sub>1/2</sub> de la rodopsina sola y de la rodopsina en presencia de AC 2,5 µM. En la última fila se muestra la media y el error de las cinco muestras. ....	42
Tabla 4.3. Resultados obtenidos del t <sub>1/2</sub> y del % de regeneración de la rodopsina sola y de la rodopsina en presencia de CH 2,5 µM. En la última fila se muestra la media y el error de las tres muestras. ....	46
Tabla 4.4. Resultados obtenidos del t <sub>1/2</sub> y del % de regeneración de la rodopsina sola y de la rodopsina en presencia de AC 2,5 µM. En la última fila se muestra la media y el error de las tres muestras. ....	48

## 7. ANEXOS

Figura 1. Espectro UV-visible a 20°C de la disolución de HEPES 100 mM pH 7,4 que contiene 0.05% DM, junto con EtOH y DMSO .....	55
Figura 2. Espectros UV-visible a 55°C a) CH/EtOH b) CH/DMSO. La [CH] fue 2,5 mM. Los experimentos se dejaron 1 h y se registró 1 espectro cada 5 min .....	55
Figura 3. Espectro de absorción UV-visible a) CH/EtOH T55°C b) CH/DMSO T55°C c) CH diluido en las tres soluciones (HEPES, EtOH y DMSO) T20°C. La [CH] fue 2,5 µM. Los experimentos se dejaron 1 h y se registró 1 espectro cada 5 min .....	56
Figura 4. Espectro UV-visible a 20°C. a) AC/EtOH b) AC/DMSO. Las [AC] fueron de 25 mM, 2,5 mM, 0,25 mM y 2,5 µM .....	57
Figura 5. Espectro UV-visible a 55°C. a) AC/EtOH b) AC/DMSO. Las [AC] fue 2,5 µM. Se realizó un espectro cada minuto durante 1 h. ....	57

## Abreviaturas

$A_{500}$ : absorbancia a 500 nm

$A_{500AI}$ : absorbancia a 500 nm antes de iluminar

$A_{500DI}$ : absorbancia a 500 nm después de iluminar

$A_{500F}$ : absorbancia a 500 nm final

$A_{500F_{ilu}}$ : absorbancia a 500 nm final iluminada

$A_{500I}$ : absorbancia a 500 nm inicial

AC: Ácido Cafeico

AMD: *age-related macular degeneration*

CH: Hidrato de Catequina

Dil1/2: diluido a la mitad

Dil10v (1/10), 20v (1/20), 40v (1/40): diluido 10 veces, 20 veces, 40 veces

DM: dodecil maltósido

DMAE: degeneración macular asociada a la edad

DMSO: dimetil sulfoxido

ERO: Especies reactivas del oxígeno

EPR: epitelio pigmentario de la retina

GPCR: *G-protein coupled receptor*

HEPES: ácido [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico]

ROS: *rod outer segment*

Rosol: rodopsina solubilizada

rpm: revoluciones por minuto

$t_{1/2}$ : tiempo de vida media

UV-vis: Ultravioleta Visible

%REG: tanto por ciento de regeneración

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los fenoles son sustancias de origen vegetal. Pueden ir de los más simples, como los derivados hidroxilados de ácidos benzoico y cinámico, hasta los más complejos como los polifenoles o flavonoides. Se encuentran en los alimentos que consumimos diariamente como el aceite de oliva, el cacao, el té, el vino entre otros. Los fenoles suelen tener un impacto favorable en la calidad de los alimentos, por sus propiedades antioxidantes que ayudan a la conservación de los lípidos poliinsaturados; por proporcionar colorantes naturales, etc (Nkhili et al., 2014).

Su estructura química está compuesta por un anillo bencénico y uno o varios grupos hidroxilo (Figura 1.1) (Matias, 2015). Estos compuestos se pueden clasificar en flavonoides o no flavonoides (Valls, 2000) según si tienen o no la estructura característica de estos (Figura 1.2). Por un lado, dentro de los flavonoides encontramos los flavonoles, flavononas, flavanones, flaonas, flavanoles (como taninos o proantocianidinas), las antocianidinas y antocianos. Y por otro lado, los ácidos fenólicos (derivados del ácido benzoico y cinámico), los fenoles no carboxílicos (Gimeno, 2004) y los estilbenos (como el resveratrol) pertenecen a los compuestos no flavonoides (Valls, 2000).

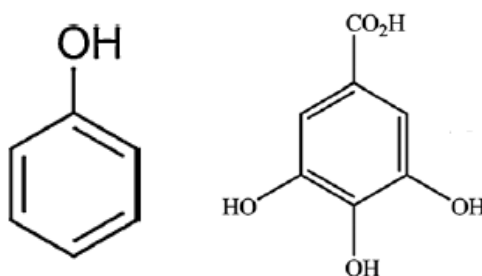


Figura 1.1. A la izquierda: estructura química del fenol. A la derecha: estructura química del ácido gálico, que es un tipo de ácido fenólico.

Además, son considerados beneficiosos para la prevención y el desarrollo de enfermedades degenerativas como son la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, cáncer y los trastornos relacionados con la edad. Esto es posible gracias a la combinación de algunas de sus propiedades biológicas como la antioxidante y la antiinflamatoria.

Los fenoles más frecuentes en las plantas y en los alimentos de nuestra dieta son los ácidos fenólicos, los flavonoides y los flavonoles (Nkhili et al., 2014), un ejemplo sería el ácido cafeico, la catequina y la rutina respectivamente.

## 1.2. FLAVONOIDES

Los flavonoides son sustancias vegetales que fueron descubiertas por Albert Szent-Györgvi, quien las denominó “vitamina P” de permeabilidad (Martínez-Flórez et al., 2002). Descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación (Martínez, 2005). Los flavonoides están compuestos por diferentes tipos de sustancias naturales, entre ellas se encuentran las que les aportan color a hojas y frutos, como el amarillo, naranja, rojo, violeta y azul.

Se encuentran ampliamente en los productos alimenticios de origen vegetal, como por ejemplo: frutas, verduras, nueces, semillas, especias y bebidas como el té y el vino.

Son compuestos fenólicos de baja toxicidad, presentan propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, hepatoprotectoras, inhibidoras de enzimas, etc. Su consumo regular se asocia a un riesgo reducido y a una importante función protectora frente a una serie de enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos. (Martínez, 2005; Martino, 2000; Pérez, 2003). La mayoría de estos efectos beneficiosos provienen de sus propiedades antioxidantes, de eliminación de radicales libres y su capacidad para modular muchas funciones del enzima celular (Hanneken et al., 2006).

### 1.2.1. Propiedades químicas

Los flavonoides tienen una estructura química muy definida: presentan dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono (Bedascarrasbure et al., 2004). Se denominan compuestos  $C_6C_3C_6$  (Figura 1.2 y 1.3).

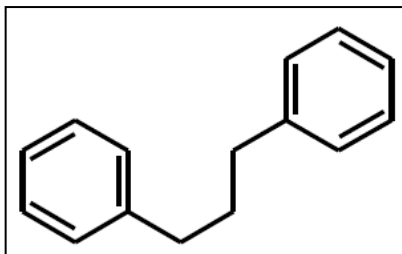


Figura 1. 2. Estructura básica de los flavonoides.

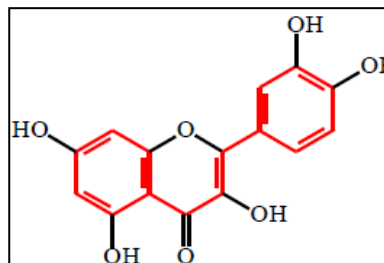


Figura 1.3. Estructura química de uno de los flavonoides más comunes. Color rojo, estructura básica de los flavonoides.

Los flavonoides se pueden clasificar en varios grupos según las variantes estructurales que presenta la cadena central C3 (Figura 1.4 y 1.5): Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc.

Mayoritariamente, los flavonoides se encuentran ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico más una o varias unidades carbónicas se les denomina glicósidos, y cuando no están unidas a moléculas de carbohidratos se llaman agliconas flavonoides.

Otro tipo de flavonoides, las antocianinas, se encuentran en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul. Las antocianinas se utilizan como colorantes de

alimentos y medicamentos. Las antocianinas de los frutos y hojas del arándano presentan propiedades vasoprotectoras y contra desórdenes oftalmológicos.

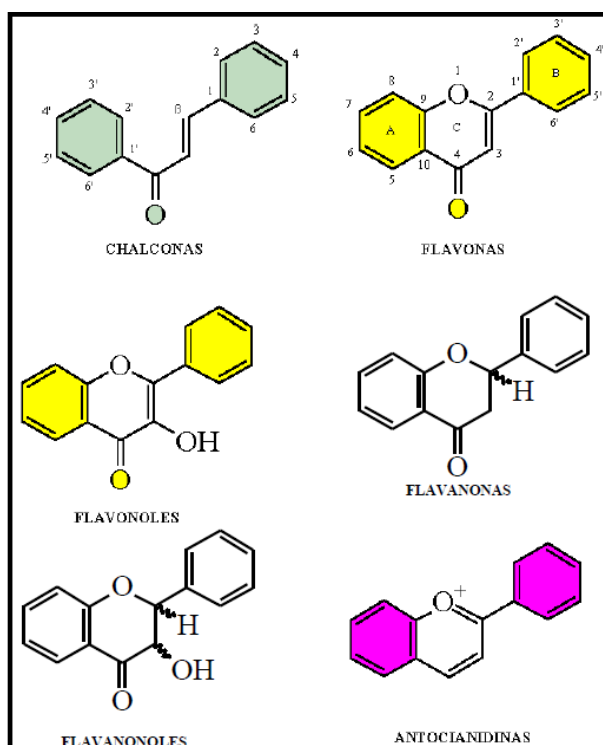


Figura 1.4. Estructura química de las clases de flavonoides: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanosoles y antocianinas.

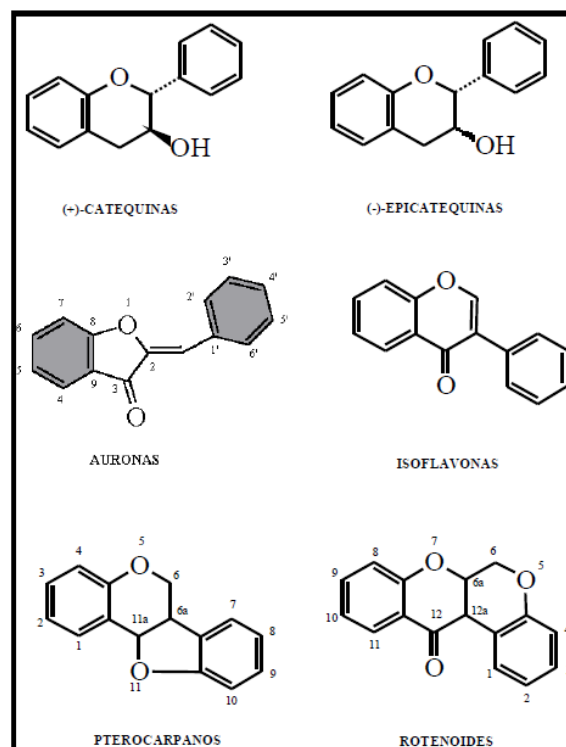


Figura 1.5. Estructura química de las clases de flavonoides: catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonas, pterocarpanos y rotenoides.

### 1.2.2. Distribución

Una gran mayoría de los flavonoides se encuentran en las plantas verdes, por el contrario en hongos y algas se han detectado solo unos pocos.

Raramente se encuentran flavonoides de diferentes clases en un mismo tejido vegetal.

Los flavonoides se hallan en la pulpa de frutos como los cítricos, cerezas, uvas, albaricoques, etc. La pimienta verde, el brócoli, las cebollas, los tomates, algunos cereales (ej. trigo), semillas, té verde, vino tinto y ciertas especias como el perejil y el orégano. También están presentes en plantas aromáticas que tienen acción terapéutica.

Cabe señalar que la presencia de flavonoides en los vegetales y frutas depende de la variedad, la ubicación y el tipo de cultivo, así como la parte morfológica específica de la planta.



### 1.2.3. Propiedades físicas

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide y de cómo se encuentre (libre, o en forma de glicósido o de sulfato). Las flavonas, flavonoles y auronas pueden presentar coloraciones desde el amarillo hasta el rojo. Las antocianinas son de color rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanonoles presentan la actividad óptica debido al carbono quiral C-2. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, y las agliconas y los altamente metoxilados son sólidos cristalinos.

### 1.2.4. Propiedades biológicas

A los flavonoides se les ha atribuido la acción antiinflamatoria (Mojzis et al., 2008) que la poseen por inhibición de la peroxidación del ácido araquidónico (Matino, 2000), esto se debe a su acción antioxidante y a su habilidad de actuar contra las histaminas y otros mediadores de los procesos inflamatorios, como las prostaglandinas y los leucotrienos. También se les ha asociado (Kolowoska et al., 2014) con propiedades farmacológicas como inhibidores de enzimas, anticancerígenos, antibacterianos y antivirales.

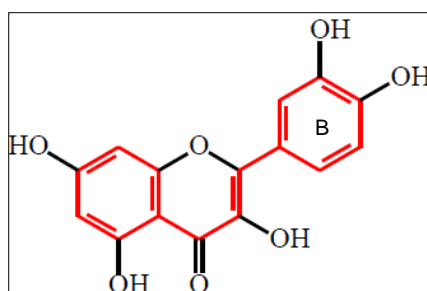


Figura 1.6. Estructura química de la quercetina.

Por otra parte, la actividad antioxidante de los flavonoides es debida a la estructura química de estos. Es mayor cuando en las posiciones 3' y 4' del anillo B están los sustituyentes dihidroxílicos y este efecto es consolidado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, en la posición 3 un grupo OH libre, y en la posición 4 un grupo carbonilo. Un ejemplo sería la quercetina (Figura 1.6). Otro de los mecanismos por los cuales los flavonoides tienen propiedades antioxidantes es la inhibición de oxidasas (Pérez, 2003) y eliminación de radicales libres (Stefek et al., 2011).

La actividad antibacteriana de los flavonoides es debida a su capacidad para inactivar las proteínas de adhesión y el transporte de células microbianas. Por otra parte, el anillo B de los flavonoides puede formar enlaces de hidrógeno con las bases de ácidos nucleicos y, además, ejecutar la inhibición de la síntesis de ADN y ARN en bacterias. Este mecanismo es también la base de sus propiedades antivirales, ya que pueden inhibir las polimerasas virales uniéndose a los ácidos nucleicos o proteínas del virus (Mierziak et al., 2014).

El estrés oxidativo y la inflamación se han implicado en la iniciación y la progresión de enfermedades oculares relacionadas con la edad como, cataratas, glaucoma y degeneración macular. Esta pérdida del equilibrio entre los mecanismos oxidativos también ocurre en la cirugía ocular (Manzanas, 2001). Las sustancias capaces de mejorar estos mecanismos son los flavonoides, que desempeñan un papel importante en la prevención y tratamiento de estas enfermedades, con su capacidad para eliminar los radicales libres (Rhone et al., 2008). En un estudio, se observó que los flavonoides fueron significativamente más eficaces que las vitaminas C o E en la protección de las células del epitelio pigmentario de la retina del estrés oxidativo *in vitro* (Hanneken et al., 2006). La fisetina, que es un flavonoide ampliamente distribuido en frutas y

verduras como las fresas, manzanas, uvas, cebollas, pepinos, etc. presenta una amplia variedad de actividades como antioxidante, anti-inflamatorio, y antiangiogénico. La fisetina junto con luteolina, quercetina, entre otros flavonoides, se encontró que protegían las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) de la muerte inducida por estrés oxidativo (Yao et al., 2008).

Los flavonoides pueden tener tanto efectos antioxidantes como prooxidantes, dependiendo de las condiciones del experimento: la concentración que se alcance en el sitio donde se forman las especies reactivas del oxígeno (ERO); la estabilidad del radical del flavonoide formado al dar un átomo de hidrógeno al radical atacante; la lipofilicidad para ser captados por la membrana y el pH del medio (Pérez, 2003).

Además, son útiles en desordenes circulatorios de la retina y el ojo y en el tratamiento de enfermedades oculares como, por ejemplo, la retinopatía diabética.

Algunos estudios han demostrado (Martínez, 2005) que la quercetina tiene efectos antiinflamatorios y que inhibe la enzima que convierte la glucosa en sorbitol (que está relacionado con las complicaciones diabéticas). Además, inhibe la formación de cataratas en animales diabéticos. La quercetina contribuye al mantenimiento de transparencia del cristalino (Stefek et al., 2011).

Según los conocimientos actuales, se debe promover una dieta que incluya los productos que contienen flavonoides. Sin embargo, se debe enfatizar en que la toxicidad de los flavonoides que se consumen en grandes dosis sigue siendo desconocida.

#### **1.2.5. Funciones**

Los flavonoides tienen un papel muy importante en las funciones de las plantas (Martínez, 2005; Martino, 2000):

- Protegen frente a la radiación UV, tienen la capacidad de absorber radiaciones ultravioleta por sus propiedades antioxidantes, así protegen a los tejidos vegetales y participan en la fotosíntesis.
- Participan en la reproducción, atrayendo insectos para favorecer la polinización mediante su gran variedad de colores presentes en los tejidos de las flores.
- Son un mecanismo químico de defensa vegetal, ya que aumenta la resistencia de algunas plantas contra infecciones y enfermedades vegetales provenientes de insectos y microorganismos.
- Actúan como reguladores del crecimiento vegetal, inhibiendo ciertas hormonas vegetales.

### 1.3. CATEQUINA

El hidrato de catequina o Catequina (Figura 1.7), es un flavonoide polifenólico natural que se haya en los frutos de las plantas y está en muchos productos de nuestra dieta como el aceite de oliva, vino rosado, té verde, cerveza, cacao, fruta, etc.

Tiene propiedades antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antibacterianos y antivirales, además de potenciador inmunológico para proteger de las enfermedades coronarias, neurodegenerativas y inflamatorias y evitar el crecimiento de células cancerígenas (Alshatwi et al., 2014). En el ojo, el extracto de té verde protege al cristalino de los rayos UV e inhibe la muerte celular en el epitelio del cristalino (Stefek et al., 2011).

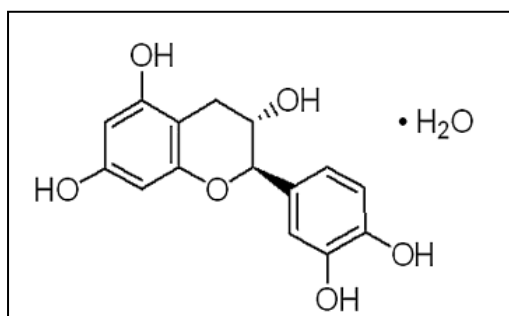


Figura 1. 7. Estructura molecular de la catequina.

El glutamato, es un neurotransmisor de la retina situado en la retina interna y en el epitelio pigmentario de la retina. El glutamato modifica los lípidos y las expresiones de siete proteínas en un sistema de retina-receptor libre homogeneizada. El aumento de los niveles de glutamato están asociados con el daño de las células de la retina produciendo una serie de enfermedades, como por ejemplo, el glaucoma y la retinopatía diabética. La catequina es uno de los flavonoides que puede proteger el tejido de la retina de la peroxidación de los lípidos y el daño a las proteínas inducido por el glutamato (Siu, 2008).

### 1.4. ÁCIDO CAFEICO

El ácido cafeico (AC) (Figura 1.8) es un compuesto fenólico que se puede encontrar en las plantas, verduras, frutas y café. El AC presenta actividades biológicas, como por ejemplo, anticancerígena, antioxidante, antiangiogénica y antiinflamatorias.

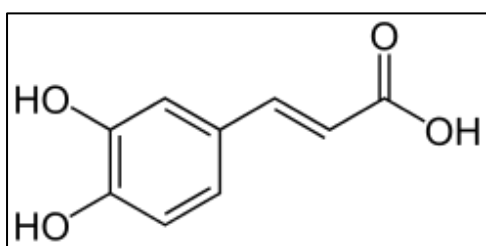


Figura 1. 8. Estructura molecular del ácido cafeico.

La angiogénesis patológica, es la causa más común de pérdida de visión provocando enfermedades como la retinopatía del prematuro, la retinopatía diabética y la degeneración macular asociada a la edad. En un estudio, se demostró que la propiedad antiangiogénica del AC inhibía la proliferación y migración de células endoteliales de la retina inducida por crecimiento endotelial vascular y su neovascularización, ésta actividad estaba relacionada con la actividad antioxidante (Kim et al., 2009).

El ácido cafeico se podría utilizar farmacológicamente para tratar patologías retinianas como la retinopatía diabética, DMAE, etc.

## 1.5. RODOPSINA

Los fotorreceptores pueden responder a la luz debido a que contienen altas concentraciones de pigmento visual en las membranas de los discos de sus segmentos externos. El pigmento visual de los bastones es la rodopsina (Serrano et al., 2006).

La rodopsina es una glucoproteína monomérica integral de membrana que forma parte de una familia de proteínas denominada receptores acoplados a proteínas G o GPCR (G-protein coupled receptor). La rodopsina absorbe la luz en la longitud de onda de 500 nm (amarilla), transmite el violeta y el rojo por lo que tiene una apariencia púrpura (Riquelme et al., 2010).

La rodopsina (Figura 1.9) está compuesta por una proteína transmembrana llamada opsina, esta se localiza en la membrana de los discos y está unida covalentemente a un cromóforo llamado retinal derivado de la vitamina A, la forma unida a opsina es 11-*cis*-retinal. La opsina es una cadena polipeptídica formada por 348 aminoácidos (Ramón et al., 2002).

Consta estructuralmente de tres dominios diferenciados:

- Dominio citoplasmático, que se corresponde con el extremo C-terminal y es donde la proteína G se une para producir la transducción de la señal luminosa durante el proceso visual.
- Dominio transmembrana que consta de 7 hélices que perpendicularmente cruzan la membrana celular. Sus interacciones con los componentes hidrofóbicos de la membrana de los discos del bastón producen una disposición en forma de barril haciendo que el 11-*cis*-retinal quede en el interior (configuración inestable), absorba la luz y se isomerize a todo-*trans*-retinal (configuración más estable) activando la rodopsina y iniciándose así el proceso de la visión (Figura 1.9).
- Dominio extracelular que se corresponde con el extremo N-terminal. El que controla la actividad de la rodopsina.

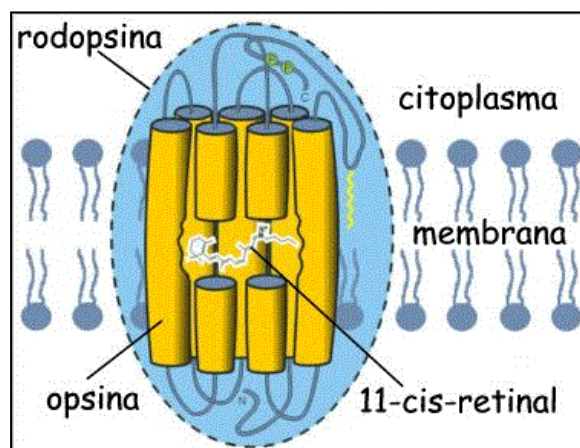


Figura 1.9. Estructura de la rodopsina.

### 1.5.1. Fotoactivación y regeneración de la rodopsina

Cuando la rodopsina entra en contacto con la luz, se inicia el proceso de fotoactivación, y empieza a descomponerse cambiando su estructura, hasta la completa disociación del retinal de la opsina, esto es debido a que los fotones de la luz provocan un cambio de conformación de la forma “cis” del retinal a la “trans”. En este proceso obtenemos la rodopsina activada, a continuación ésta provoca la hiperpolarización de la membrana externa de los bastones para ser blanqueada y así empezar el proceso visual. Para ello, el retinal se disocia de la opsina por hidrólisis, y este pasa a la forma retinol.

Para que la rodopsina se regenere es necesario que este proceso ocurra en total oscuridad y de la siguiente manera: el todo-*trans*-retinal que es liberado en la fotoactivación de la rodopsina, es transformado en todo-*trans*-retinol mediante una enzima que se encuentra en el segmento externo de los bastones denominada retinol-deshidrogenasa (Urtubia, 1999). Acto seguido, desde el segmento externo, el todo-*trans*-retinol migra al epitelio pigmentario de la retina y se convierte en 11-*cis*-retinol por acción de una isomerasa (Hill, 2004). El 11-*cis*-retinol vuelve al segmento externo del bastón, y allí entra en contacto con el retinol, generándose así el 11-*cis*-retinal. El 11-*cis*-retinal se une a la opsina para formar rodopsina y comenzar otro ciclo de fotoactivación.

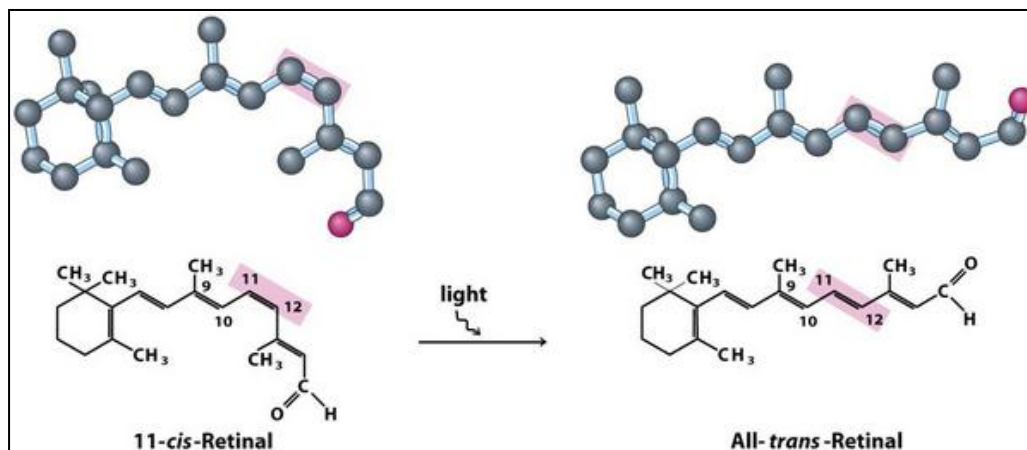


Figura 1.10. La rodopsina contiene en su estructura el retinal. Al ser absorbidos los fotones inducen un cambio del retinal convirtiéndolo de la forma 11-*cis*-retinal a la forma todo-*trans*-retinal.



## 2. OBJETIVOS

Como hemos indicado en la introducción de este trabajo, los compuestos fenólicos están presentes en alimentos de consumo diario y muchos de ellos se consideran beneficiosos en la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades. La catequina es un flavonoide que puede proteger el tejido de la retina (Siu, 2008) y el ácido cafeico presenta propiedades antiangiogénicas (Kim et al., 2009).

Los objetivos que nos hemos planteado en este proyecto son:

1. comprobar si los compuestos fenólicos hidrato de catequina y ácido cafeico pueden llegar a afectar a la estabilidad térmica y a la capacidad de regeneración de la rodopsina y, en el caso de que así sea de qué manera lo hacen.
2. estudiar si existe algún tipo de interacción entre estos compuestos fenólicos y la rodopsina.

Para alcanzar estos objetivos hemos realizado experimentos de estabilidad térmica y de regeneración de la rodopsina en presencia y en ausencia de hidrato de catequina y de ácido cafeico. Los experimentos se han realizado *in vitro* y la técnica utilizada ha sido la espectrometría UV-visible.

En los experimentos de estabilidad térmica, medimos la disminución de la absorbancia a 500 nm a medida que pasa el tiempo de la rodopsina con o sin el compuesto fenólico y calculamos el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) (tiempo necesario para que la absorbancia sea el 50% del valor inicial) en cada caso. Con este experimento, queríamos averiguar si la rodopsina al estar en contacto con el de hidrato de catequina o con el ácido cafeico, se desnaturaliza más lentamente, y por tanto mantiene mejor su estructura y función.

Los ensayos de regeneración de la rodopsina se realizaron con 9-*cis*-retinal en presencia o en ausencia de hidrato de catequina o ácido cafeico. En este caso se observa que la  $A_{500}$  va aumentando con el tiempo y lo que se determina en este caso es el tiempo necesario para que la rodopsina regenere el 50% del total. Pretendíamos saber si la rodopsina al estar en contacto con el hidrato de catequina o con el ácido cafeico regenera en un porcentaje mayor o menor que cuando está sola y si el proceso se lleva a cabo con mayor o menor rapidez.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos y materiales

Los reactivos y disolventes utilizados en el proyecto han sido:

9-*cis*-retinal (Sigma-Aldrich)

Ácido cafeico (Sigma-Aldrich)

Ácido Sulfúrico 2N

Dodecil Maltósido (Anatrace)

DMSO

Etanol (Panreac)

HEPES (ácido [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico])

Hidrato de catequina (Sigma-Aldrich)

Hielo

Rodopsina extraída de retinas bovinas

Y por lo que respecta al material y equipos:

Eppendorfs de 1 y de 2 ml

Membranes Millex HA filter de MF Millipore 0,45  $\mu$ m

Micropipetas de 10, 200 y 1000  $\mu$ l.

Pipetas de 5 y 10 ml.

Vasos de precipitados de 50 ml

Matraces aforados de 10, 25 y 100 ml

Espectrofotómetro UV-Vis Cary (100Bio) Dual Beam.

Controlador de temperatura Peltier; Cary.

Baño termostático de agua DARLAB.

Centrífuga ORTO-ARLESA; BIOGEN.

Centrífuga de Eppendorfs Spectrafuge mini-centrifuge; Sigma-Aldrich.

Balanza de precisión QUALITY.

Lámpara con filtro rojo.

Fuente de iluminación FIBER Lite MI-150 y filtro de  $\lambda > 495$  nm.

Cubetas oscuras de cuarzo para el espectrofotómetro y tapones para evitar evaporación del contenido.

## 3.2 Métodos

Empezaremos por una breve introducción de los métodos que se han llevado a cabo para realizar éste proyecto.

### 3.2.1 Solubilización de rodopsina en presencia de detergente DM

En un eppendorf en el que tenemos 50 µl DM 10% y 250 µl H<sub>2</sub>O milliQ se adicionan 200 µl de rodopsina de ROS. Para evitar el blanqueo la rodopsina se debe manipular en la oscuridad, se utilizó una lámpara de luz roja. Agitar 1h a 4°C en la oscuridad.

- Centrifugar a 4°C 30 min a 8000 rpm
- Sacar sobrenadante y se pone 100 µl en un eppendorf
- Se toman 100 µl y se realiza el espectro. La concentración de la disolución de rodopsina se calcula aplicando la ley de Lambert-Beer:  $A_{500} = \varepsilon \cdot b \cdot c$

siendo  $\varepsilon = 40600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

### 3.2.2. Preparación del tampón HEPES 1M pH=7,4 100mL

$$0.100 \text{ l} \cdot \frac{1 \text{ ml}}{1 \text{ l}} \cdot \frac{238.31 \text{ g}}{1 \text{ ml HEPES}} = 23,831 \text{ g HEPES}$$

- Pesar 23,831g HEPES en un vaso de precipitados pequeño (100 ml)
- disolver en aprox. 50 ml agua MilliQ
- ajustar el pH a 7,4 con NaOH (0,5g)
- trasladar a un aforado de 100 ml, enrasar con agua MilliQ y homogeneizar
- Filtrar a través de filtros 0,45 µm y guardar en tubos.

### 3.2.3. Preparación HEPES 100 mM contiene 0,05% DM

Introducir 10 ml de HEPES 1M en un aforado de 100 ml y enrasar con agua MilliQ. Sacar 500 µl de disolución y añadir 500 µl DM 10%.

### 3.2.4. Espectrofotometría UV-visible

La espectrofotometría UV-visible, es una técnica experimental que nos permite saber la concentración de un compuesto, a través de la cantidad de luz absorbida por ésta disolución en la longitud de onda que queremos estudiar aplicando la ley de Lambert-Beer. Esto es posible gracias a la capacidad de las moléculas para absorber estas radiaciones. La cantidad de absorbancia y la longitud de onda a la que pueden absorber las disoluciones depende de su estructura y las condiciones del medio como la temperatura, pH, etc.

La espectrofotometría se lleva a cabo con unos instrumentos llamados espectrofotómetros. Hay espectrofotómetros de un solo haz, es decir que tienen un solo espacio para poner una cubeta y de doble haz, con dos sitios para dos cubetas.

En nuestro caso se trabajará con el de doble haz. Los espectrofotómetros están formados por las siguientes partes:

1. Una fuente de luz: lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Sistema óptico: a través de filtros, lentes y redes de difracción se focaliza el haz de luz y se selecciona una longitud de onda.
3. Un espacio donde colocar las cubetas que contengan la muestra. Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente o negro. Nosotros hemos utilizado las negras.
4. Sistema óptico: recibe la luz transmitida por la muestra, la focaliza y selecciona por longitudes de onda.
5. Un detector que recibe la cantidad de luz transmitida en cada longitud de onda y convierte las señales luminosas en señales eléctricas.
6. Un ordenador que procese los datos.

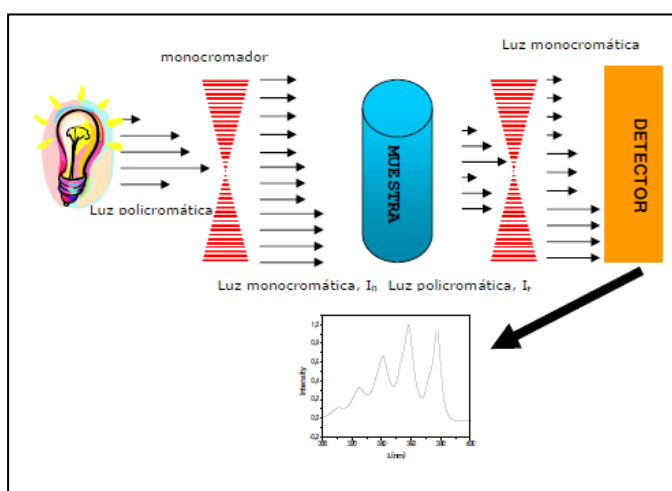


Figura 3.1. Funcionamiento del espectrofotómetro.

Los experimentos que se llevaron a cabo con esta técnica fueron: estabilidad térmica, regeneración y acidificación de la rodopsina en presencia y en ausencia de catequina o de ácido cafeico

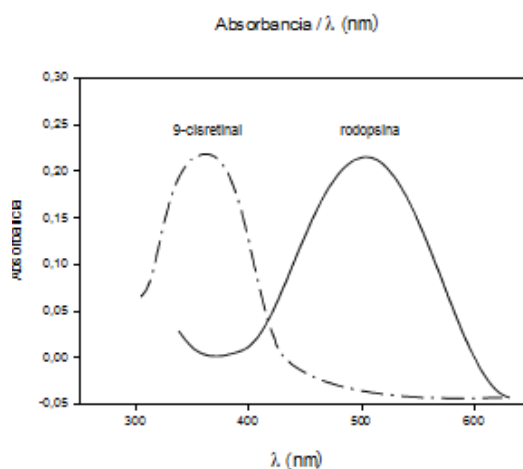


Figura 3.2. Representación gráfica de la absorbancia de la rodopsina a 500 nm y del 9-*cis*-retinal a 373 nm.

A continuación, presentaremos detalladamente los experimentos realizados:

### **3.2.4.1. Estabilidad térmica de la rodopsina en presencia y ausencia de CH**

#### **3.2.4.1.1. Hidrato de Catequina a 20°C y 55°C**

Para caracterizar el comportamiento UV-Visible del CH se realizan los espectros de una disolución de CH 2,5 mM en HEPES 100 mM pH 7,5 (conteniendo 0,05% DM) a 20°C y 55°C

- Línea base:  
Cubeta de referencia: 200 µl HEPES 100 mM 0,05% DM  
Cubeta de muestra: 100 µl HEPES 100 mM 0,05% DM
- Poner en la cubeta de muestra:  
90 µl HEPES 100 mM 0,05% DM +10 µl CH25,1 mM  
Hacemos espectro
- Subir la temperatura a 55°C. A esta temperatura tapamos las cubetas para que no se evapore el contenido.
- Preparamos al espectrofotómetro para que realice 12 ciclos, 1 ciclo/5min.
- Iniciar espectro.

#### **3.2.4.1.2. Etanol y DMSO en HEPES a 20°C**

Este ensayo se realizó para comprobar que el etanol y el DMSO no absorben en el espectro visible.

- Línea base:  
Cubeta de referencia: 200 µl HEPES 100 mM 0,05% DM  
Cubeta de muestra: 100 µl HEPES 100 mM 0,05% DM
- Poner en la cubeta de muestra:  
90 µl HEPES 100 mM 0,05% DM +10 µl EtOH. Hacer espectro.  
90 µl HEPES 100 mM 0,05% DM +10 µl DMSO. Hacer espectro.



### 3.2.4.1.3. Preparación de las disoluciones de CH

Se prepararon 3 disoluciones de CH en: HEPES, Etanol y DMSO a 20°C. La concentración de CH de cada disolución madre fue de 25,1 mM.

Necesitamos tres eppendorfs de 2 ml. En cada uno de ellos ponemos 11,4 mg CH. Y para disolver ponemos 1,56 ml del disolvente (HEPES; etanol o DMSO). De esta disolución se toman 10 µl CH y en la cubeta se llevan a un volumen final de 100 µl por lo que la [CH] en la cubeta será de 2,51 mM

- Línea base:  
Cubeta de referencia: 200 µl HEPES 100 mM 0,05% DM  
Cubeta de muestra: 100 µl HEPES 100 mM 0,05% DM
- Poner en la cubeta de muestra:  
90 µl HEPES 100 mM 0,05% DM +10 µl CH/HEPES. Hacer espectro.  
90 µl HEPES 100 mM 0,05% DM +10 µl CH/EtOH. Hacer espectro.  
90 µl HEPES 100 mM 0,05% DM +10 µl CH/DMSO. Hacer espectro.
- Subir la temperatura a 55°C. A esta temperatura tapamos las cubetas para que no se evapore el contenido.
- Hacemos los mismos experimentos que a 20°C pero a 55°C.  
Preparamos al espectrofotómetro para que realice 12 ciclos, 1 ciclo/5min para cada muestra.

Las disoluciones madre se diluyeron 1/1000 para obtener disoluciones de concentraciones 25,1 µM con las que se trabajaron.

Repetimos los experimentos 3.2.4.1.1 y 3.2.4.1.3, pero con una concentración de CH en la cubeta de 2,51 µM.

### 3.2.4.1.4. Estabilidad térmica de la rodopsina a 55°C

- Para realizar la línea base:  
Cubeta de referencia: 200 µl HEPES 100 mM 0,05% DM  
Cubeta de muestra: 100 µl HEPES 100 mM 0,05% DM
- Tras realizar la línea base, lavamos y secamos la cubeta de muestra y en ella ponemos:  
60 µl HEPES 100 mM 0,05% DM +40 µl rossoldil1/2  
(Rossoldil1/2: 50µlrossol + 50µlHEPES). La disolución de rodopsina se diluyó con la finalidad de obtener  $A_{500}$  de aprox. 0.02.
- Programar espectrofotómetro: 60 ciclos, 1ciclo/1min. Iniciar programa.
- Al acabar, iluminar muestra con luz blanca durante 1minuto y hacer espectro. Iluminamos la muestra para que se blanquee la rodopsina y tenga absorbancia 0 a 500 nm.

- Repetimos el experimento 4 veces, 1 vez cada sesión.

#### **3.2.4.1.5. Estabilidad térmica de la rodopsina con CH 2,51 mM a 55°C**

- Primero se realiza la línea base:  
Cubeta de referencia: 180 µl HEPES 100 mM 0,05% DM+20 µl CH 25,1 mM  
Cubeta de muestra: 90 µl HEPES 100 mM 0,05% DM+10 µl CH 25,1 mM
- Lavar y secar cubeta de muestra
- Poner en la cubeta de muestra:  
50 µl HEPES 100 mM 0,05% DM +40 µl rossoldil1/2 +10 µl CH 25,1 mM
- Programar espectrofotómetro: 60 ciclos, 1ciclo/1min. Iniciar programa.
- Al acabar, iluminar muestra con luz blanca durante 1 minuto y hacer espectro.
- Repetimos el experimento 3 veces.

En cada sesión es conveniente hacer un experimento de estabilidad térmica con rodopsina sola y otro con rodopsina y CH para poder comparar.

#### **3.2.4.1.6. Estabilidad térmica de la rodopsina con CH 5,02 mM a 55°C**

- Primero se realiza la línea base:  
Cubeta de referencia: 160 µl HEPES 100 mM 0,05% DM+40 µl CH 25,1 mM  
Cubeta de muestra: 80 µl HEPES 100 mM 0,05% DM+20 µl CH 25,1 mM
- Lavar y secar cubeta de muestra
- Poner en la cubeta de muestra:  
40 µl HEPES 100 mM 0,05% DM +40 µl rossoldil1/2 +20 µl CH 25,1 mM
- Programar espectrofotómetro: 60 ciclos, 1ciclo/1min. Iniciar programa.
- Al acabar, iluminar muestra con luz blanca durante 1 minuto y hacer espectro.
- Repetimos el experimento 3 veces.

**3.2.4.1.7. Estabilidad térmica de la rodopsina con CH 2,52  $\mu$ M a 55°C**

- Línea base:  
Cubeta de referencia: 180  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM+20  $\mu$ l CH 25,2  $\mu$ M  
Cubeta de muestra: 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM+10  $\mu$ l CH 25,2  $\mu$ M
- Lavar y secar cubeta de muestra
- Poner en la cubeta de muestra:  
50  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +40  $\mu$ l rossoldil1/2 +10  $\mu$ l CH 25,2  $\mu$ M
- Programar espectrofotómetro: 60 ciclos, 1ciclo/1min. Iniciar programa.
- Al acabar, iluminar muestra con luz blanca durante 1 minuto y hacer espectro.
- Repetimos el experimento 2 veces.

**3.2.4.2. Estabilidad térmica de la rodopsina en presencia y ausencia de AC****3.2.4.2.1. Preparación de las disoluciones de AC**

Se prepararon 3 disoluciones de AC en: HEPES, Etanol y DMSO a 20°C. La concentración de AC de cada disolución madre fue de 25 mM.

Para preparar estas disoluciones, necesitamos 3 eppendorf:

4,9 mg AC disuelto en 1,1 ml de HEPES

2,3 mg AC disuelto en 0,51 ml de DMSO

3,8 mg AC disuelto en 0,84 ml de EtOH

Estas disoluciones se diluyeron 1/1000 para obtener disoluciones de concentraciones 25  $\mu$ M con las que se trabajaron.

Con éstas disoluciones realizamos los siguientes ensayos:

- Primero realizamos la línea base:  
Cubeta de referencia: 200  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM  
Cubeta de muestra: 100  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM
- Poner en la cubeta de muestra :
  - 100  $\mu$ l AC 25mM /HEPES o EtOH o DMSO.
  - 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 2,5 mM /HEPES.
  - 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 2,5 mM /EtOH.
  - 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 2,5 mM /DMSO.
  - 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 0,25 mM /HEPES.

- 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 0,25 mM /EtOH.
  - 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 0,25 mM /DMSO.
  - 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 25  $\mu$ M /HEPES.
  - 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 25  $\mu$ M /EtOH.
  - 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 25  $\mu$ M /DMSO.
  - Hacer un espectro de cada una de las muestras expuestas anteriormente.
  - Subir la temperatura a 55°C. A esta temperatura tapamos las cubetas para que no se evapore el contenido.
  - Hacemos los mismos experimentos que a 20°C, pero a 55°C y solo de la concentración 25  $\mu$ M.
- Preparamos al espectrofotómetro para: 12 ciclos, 1 ciclo/5min para cada muestra.

#### 3.2.4.2.2. Estabilidad térmica de la rodopsina a 55°C

- Línea base:  
Cubeta de referencia: 200  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM  
Cubeta de muestra: 100  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM
- Poner en la cubeta de muestra:  
10  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +90  $\mu$ l rossoldil40v. La disolución de rodopsina se diluyó 40 veces con la finalidad de obtener  $A_{500}$  de aprox. 0,02.
- Programar espectrofotómetro: 60 ciclos, 1ciclo/1min. Iniciar programa.
- Al acabar, iluminar muestra con luz blanca durante 1 minuto y hacer espectro.
- Repetimos el experimento 5 veces.

#### 3.2.4.2.3. Estabilidad térmica de la rodopsina con AC 2,5 $\mu$ M a 55°C

- Línea base:  
Cubeta de referencia: 180  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM+20  $\mu$ l AC 25  $\mu$ M  
Cubeta de muestra: 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM+10  $\mu$ l AC 25  $\mu$ M
- Después de realizar la línea base, lavamos y secamos la cubeta de muestra y en ella ponemos: 10 $\mu$ l AC 25  $\mu$ M+90  $\mu$ l rossoldil40v
- Programar espectrofotómetro: 60 ciclos, 1ciclo/1min. Iniciar programa.
- Al acabar, iluminar muestra con luz blanca durante 1 minuto y hacer espectro.
- Repetimos el experimento 5 veces.

En cada sesión es conveniente hacer un experimento de estabilidad térmica con rodopsina sola y otro en presencia de AC para poder comparar.

Se utilizó rodopsina diluida 40 veces para los experimentos comparativos entre rodopsina sola y AC, para obtener una  $A_{500}$  de aproximadamente 0,03.

### 3.2.4.3. Regeneración

#### 3.2.4.3.1. Regeneración de la rodopsina con 9-*cis*-retinal a 20°C

- Primero se realiza la línea base:  
Cubeta de referencia: 200  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05%DM  
Cubeta de muestra: 100  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM
- Sacar 20  $\mu$ l de la cubeta de muestra y poner:  
20  $\mu$ l rossoldil1/20 + 80  $\mu$ l HEPES 100 mM 0.05% DM. Hacemos espectro
- Añadir 4,5  $\mu$ l de 9-*cis*-retinal (52,8  $\mu$ M) a la cubeta de muestra. Hacemos espectro.
- Programar espectrofotómetro: 24 ciclos, 1 ciclo cada 5 minutos.
- Iluminar la muestra durante 30 seg con filtro amarillo ( $\lambda > 495$ nm). Así blanqueamos la rodopsina y vemos como el 9-*cis*-retinal va regenerándola. Iniciar espectro.
- Guardar muestra en un eppendorf.
- Repetimos el experimento 3 veces.

#### 3.2.4.3.2. Interacción entre 9-*cis*-retinal y CH o AC a 20°C

Realizamos este ensayo para ver si hay algún cambio en el comportamiento del 9-*cis*-retinal en presencia de CH o AC.

Primero hacemos la línea base:

- Cubeta de referencia: 180  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05%DM+20  $\mu$ l CH 25,2  $\mu$ M  
Cubeta de muestra: 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM+10  $\mu$ l CH 25,2  $\mu$ M
- Lavar cubeta de muestra y poner: 11,1 CH 25,2  $\mu$ M + 4,53  $\mu$ l 9-*cis*-retinal  
11,1 AC 25  $\mu$ M + 4,53  $\mu$ l 9-*cis*-retinal  
Al no estar presente la rodopsina no iluminamos con filtro amarillo
- Programar espectrofotómetro: 24 ciclos, 1 ciclo cada 5 min. Iniciar
- Repetimos el experimento 3 veces.

**3.2.4.3.3. Regeneración de la rodopsina con 9-*cis*-retinal en presencia de CH a 20°C**

- Línea base:  
Cubeta de referencia: 180 µl HEPES 100 mM 0,05% DM+20 µl CH 25,2 µM  
Cubeta de muestra: 90 µl HEPES 100 mM 0,05% DM+10 µl CH 25,2 µM
- Lavar y secar cubeta de muestra y poner:  
100 µl rossoldil1/20 + 11,1 µl CH 25,2 µM. Hacemos espectro
- Añadir 4,5 µl de 9-*cis*-retinal (52,8 µM) a la cubeta de muestra. Hacemos espectro.
- Programar espectrofotómetro: 24 ciclos, 1 ciclo cada 5 minutos.
- Iluminar la muestra durante 30 seg con filtro amarillo ( $\lambda > 495\text{nm}$ ). Iniciar espectro.
- Repetimos el experimento 3 veces.

**3.2.4.3.4. Regeneración de la rodopsina con 9-*cis*-retinal en presencia de AC a 20°C**

- Línea base:  
Cubeta de referencia: 180 µl HEPES 100 mM 0,05% DM+20 µl AC 25 µM  
Cubeta de muestra: 90 µl HEPES 100 mM 0,05% DM+10 µl AC 25 µM
- Lavar y secar cubeta de muestra y poner:  
90 µl rossoldil40v + 11,1 µl AC 25 µM. Hacemos espectro
- Añadir 4,5 µl de 9-*cis*-retinal (52,8 µM) a la cubeta de muestra. Hacemos espectro.
- Programar espectrofotómetro: 24 ciclos, 1 ciclo cada 5 minutos.
- Iluminar la muestra durante 30 seg con filtro amarillo ( $\lambda > 495\text{nm}$ ). Iniciar espectro.
- Repetimos el experimento 3 veces.

En el mismo día se realizó un ensayo con rodopsina sola y otro en presencia de CH o AC. Se utilizó rodopsina diluida 40 veces para los experimentos comparativos entre rodopsina sola y AC, para obtener una  $A_{500}$  de aproximadamente 0,03.

### 3.2.4.4. Comportamiento al acidificar

Para este experimento, primero iluminamos la muestra de rodopsina utilizando una lámpara FIBER-LITE MI-150 con filtro  $\lambda > 495$  nm (Dolan Jenner) y después la acidificamos con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N a temperatura ambiente. En nuestro caso, entre la iluminación y la acidificación se deja pasar 0 minutos y 5 minutos para hacer los respectivos espectros. Como podemos observar en la Figura 3.3, cuando pasan los 5 minutos después de acidificar, la muestra de rodopsina presenta su pico de 500 nm desplazado a una longitud de onda de aproximadamente 440nm, esto es debido a que cuando acidificamos reprotonamos la base de Schiff. La reprotonación se detecta por el pico presente a 440 nm y solo la parte de proteína que esté en conformación de Meta II será la que provocará éste pico a 440 nm (Ramón, 2004).

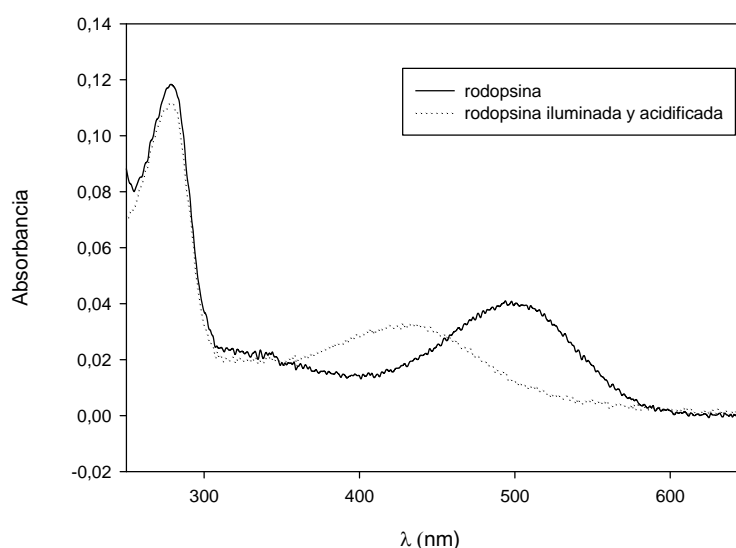


Figura 3.3. Acidificación de una muestra de rodopsina tras iluminar con lámpara FIBER-LITE MI-150 a través de un filtro  $\lambda > 495$  nm.

#### 3.2.4.4.1. Acidificación de la rodopsina

- Primero se realiza la línea base:  
Cubeta de referencia: 200  $\mu\text{l}$  HEPES 100 mM 0,05% DM  
Cubeta de muestra: 100  $\mu\text{l}$  HEPES 100 mM 0,05% DM
- Cubeta de muestra: 90  $\mu\text{l}$  HEPES 100 mM 0,05% DM + 10  $\mu\text{l}$  rossoldil10v. Hacemos espectro.
- Iluminamos con lámpara FIBER-LITE MI-150 a través de un filtro amarillo ( $\lambda > 495\text{nm}$ ) durante 30 seg. Hacemos espectro.
- Acidificamos con 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Comprobamos que el  $\text{pH} < 2$ . Hacemos espectro y a los 5 minutos volvemos hacer otro espectro.

#### 3.2.4.4.2. Acidificación de la rodopsina + CH

- Primero se realiza la línea base:  
Cubeta de referencia: 180  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM+20  $\mu$ l CH 25,2  $\mu$ M  
Cubeta de muestra: 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM+10  $\mu$ l CH 25,2  $\mu$ M
- Lavamos y secamos la cubeta de muestra y ponemos:  
80  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l CH 25,2  $\mu$ M +10  $\mu$ l rossoldil10v.  
Hacemos espectro.
- Iluminamos con lámpara FIBER-LITE MI-150 a través de un filtro amarillo ( $\lambda > 495$ nm) durante 30 seg. Hacemos espectro.
- Acidificamos con 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Hacemos espectro y a los 5 minutos volvemos hacer otro espectro.

#### 3.2.4.4.3. Acidificación de la rodopsina + AC

- Primero se realiza la línea base:  
Cubeta de referencia: 180  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM+20  $\mu$ l AC 25  $\mu$ M  
Cubeta de muestra: 90  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM+10  $\mu$ l AC 25  $\mu$ M
- Lavamos y secamos la cubeta de muestra y ponemos:  
80  $\mu$ l HEPES 100 mM 0,05% DM +10  $\mu$ l AC 25  $\mu$ M +10  $\mu$ l rossoldil40v.  
Hacemos espectro.
- Iluminamos con lámpara FIBER-LITE MI-150 a través de un filtro amarillo ( $\lambda > 495$ nm) durante 30 seg. Hacemos espectro.
- Acidificamos con 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Hacemos espectro y a los 5 minutos volvemos hacer otro espectro.



### 3.2.4.5. Reacciones de primer orden. Cálculo del tiempo de vida media

El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de un reactivo, es el tiempo que debe transcurrir para que la concentración inicial de reactivo se reduzca a la mitad (Urzúa, 2009).

En reacciones de primer orden, la ecuación de velocidad es:  $v=k\cdot[A]$

Según la definición de  $t_{1/2}$  descrita anteriormente, tenemos que:  $t=t_{1/2} \rightarrow [A]=[A]_{02}$

Utilizando la fórmula logarítmica para las reacciones de primer orden:

$$\ln[A]=\ln[A]_0-k\cdot t \quad \rightarrow \quad \ln[A]_0=\ln[A]_0-k\cdot t_{1/2} \quad \rightarrow \quad \ln[A]_0-\ln 2=\ln[A]_0-k\cdot t_{1/2} \quad \rightarrow$$

Se obtiene  $t_{1/2}=\ln 2 / K$

(Mar, 2012)

El  $t_{1/2}$  para las reacciones de orden 1 no depende de la concentración inicial del reactivo, pero sí que dependerá de la constante de velocidad ( $k$ ). Cuanto mayor sea  $k$ , más rápida será la reacción y el  $t_{1/2}$  será menor (Fernández, 2014).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Estabilidad térmica

#### 4.1.1. Estudio del comportamiento de la rodopsina a 55°C

En la figura 4.1 se muestran los espectros UV-visible de la rodopsina solubilizada en HEPES 100 mM pH 7,4 (0,05% DM). Los espectros se registraron a 55°C y se programó el aparato para que hiciera un barrido cada minuto. Como se observa en la figura, la  $A_{500}$  disminuye con el tiempo y al cabo de una hora ha desaparecido, decimos que la rodopsina se ha blanqueado.

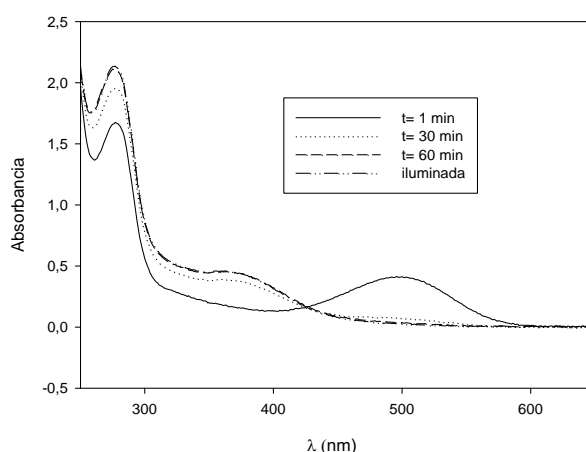


Figura 4.1. Espectro de absorción UV-visible de la rodopsina solubilizada en HEPES 100 mM pH 7,4 (0,05%DM) a 55°C, se realizaron 60 ciclos y se registró un espectro cada minuto.

Como se puede observar en la Figura 4.1, la absorbancia de la rodopsina va disminuyendo con el tiempo. A medida que va bajando la absorbancia a 500 nm, va apareciendo un pico a la longitud de onda de 370 nm aproximadamente, que es característico del retinal cuando se libera (Ramón, 2004), este proceso de decoloración de la rodopsina ocurre por efecto de la temperatura y es definido como irreversible (Reyes et al., 2011).

En la siguiente figura 4.2, se muestra la disminución de la  $A_{500}$  de la rodopsina solubilizada en función del tiempo. El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) obtenido fue de  $9,5 \pm 2$  minutos.

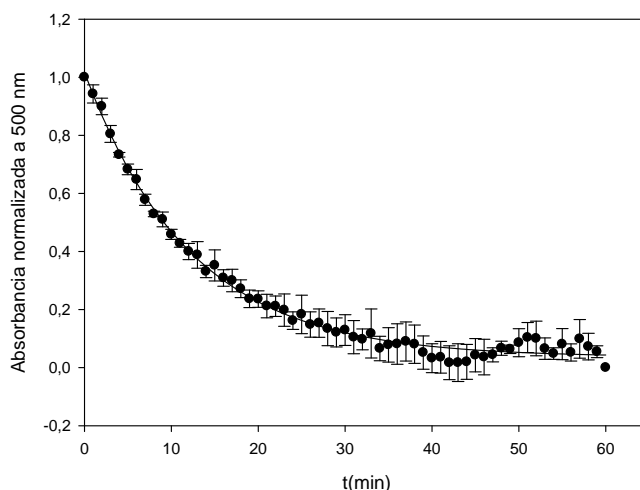


Figura 4.2. Gráfica de  $A_{500}$  media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de tres muestras

#### 4.1.2. Estabilidad térmica del CH

Para caracterizar el comportamiento UV-visible de la catequina se realizó el espectro de absorción entre 250 nm y 650 nm de disoluciones de CH en HEPES 100 mM pH 7,4 (contiene 0,05% DM), EtOH y DMSO a diferentes concentraciones y a dos temperaturas distintas: 20 y 55 °C.

En la figura 4.3 se muestran los espectros UV-visible de la rodopsina solubilizada en ausencia y en presencia de CH a diferentes concentraciones (a) y el espectro UV-visible del CH a diferentes concentraciones en HEPES comparado con el espectro de la rodopsina (b).

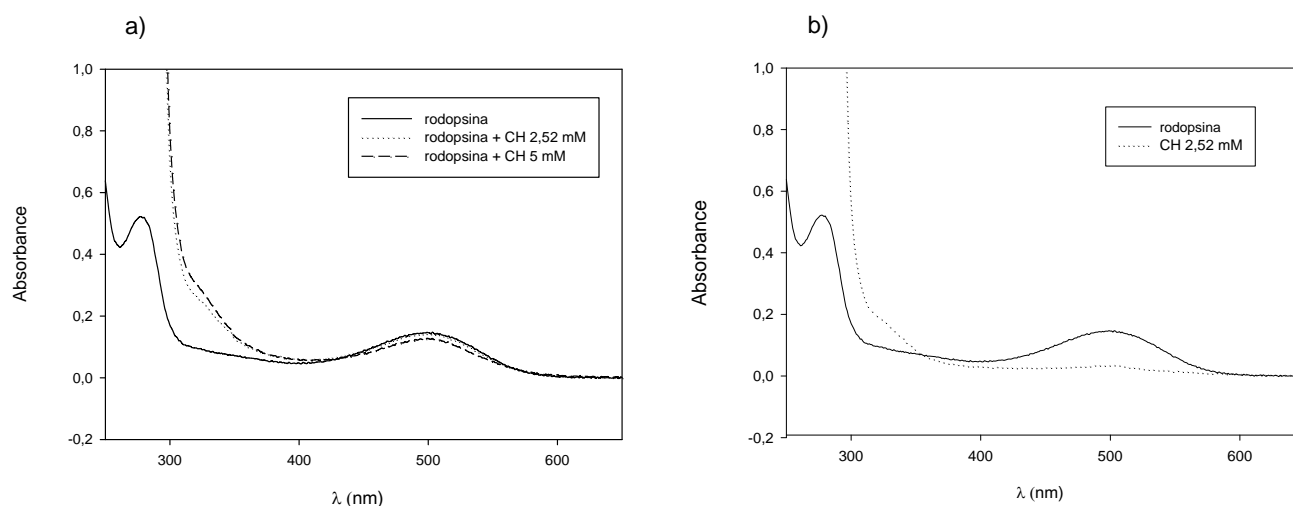


Figura 4.3. a) Comportamiento de la rodopsina solubilizada en ausencia y en presencia de CH a diferentes concentraciones (2,52 mM, 5 mM) en HEPES 100 mM (conteniendo 0,05% DM) b) Espectro de la rodopsina solubilizada y de la CH a una concentración de 2,52 mM .

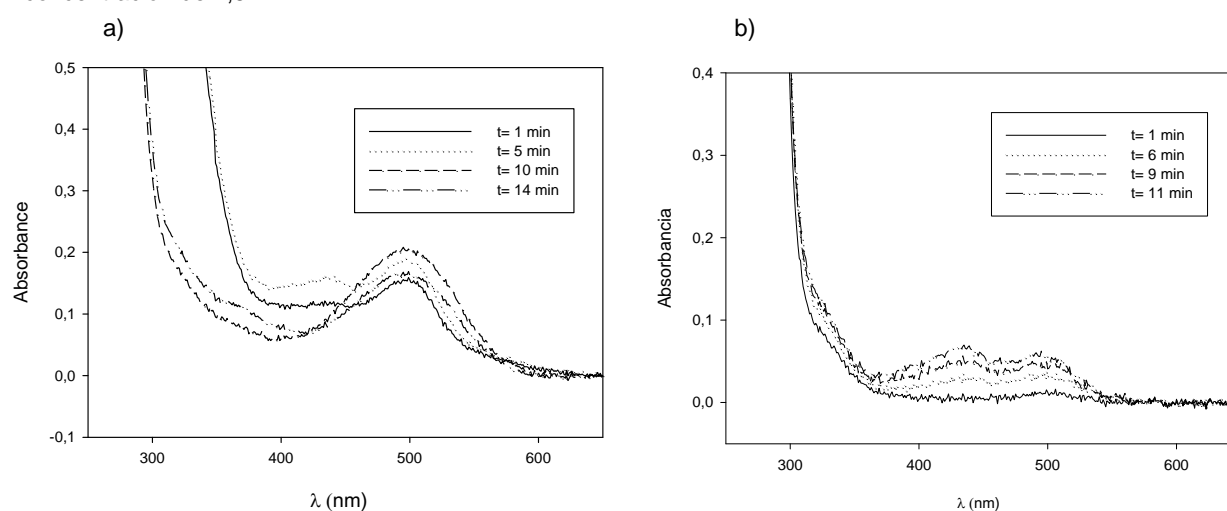


Figura 4.4. Espectros de absorción UV-visible de la CH a 55°C, se registraron los espectros durante 1 h cada minuto. a) [CH]= 2,5 mM b) [CH]= 0,25 mM.

Las Figuras 4.3 y 4.4 nos muestran que la  $A_{500}$  del CH aumenta con la concentración. Cuanto más concentrado está más absorbe a 500 nm. Tanto con una concentración de 2,5 mM como de 0,25 mM a medida que pasa el tiempo, aumenta la absorbancia a 500 nm.

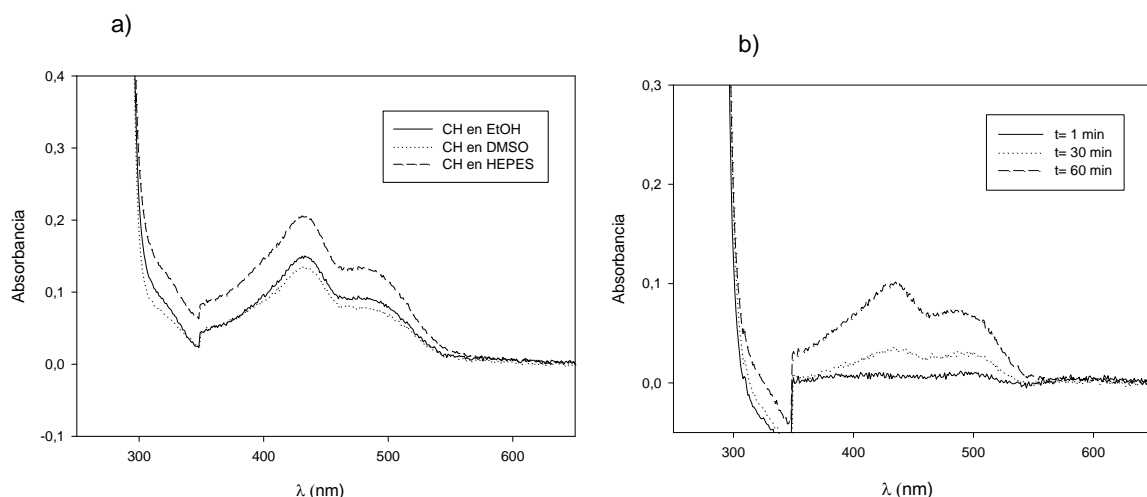


Figura 4.5. Espectros de absorción UV-visible de la CH ( $[CH]=2,5$  mM) disuelto en a) HEPES, EtOH y DMSO T20°C b) en HEPES T55°C a diferentes tiempos, se registraron 60 espectros durante 1 h, uno cada minuto.

El CH se comporta igual en las tres disoluciones, tanto en HEPES, EtOH como en DMSO a 20°C y a una concentración de 2,5 mM absorbe a 500 nm y a 430 nm, esto es debido a que el experimento se realizó primero a 55°C y seguidamente a 20°C, con lo cual la disolución no se recuperó. En cambio a una temperatura de 55°C, a medida que pasa el tiempo se incrementa la  $A_{500}$  y aparece un pico a 430 nm en los tres casos, en HEPES, en EtOH y DMSO. (Figura 4.5). Cuando probamos con una concentración de 2,52  $\mu$ M (Figura 4.6) las gráficas nos muestran que apenas hay absorbancia del CH a 500 nm en ninguna de las tres disoluciones (HEPES, EtOH y DMSO) (Anexo 1).

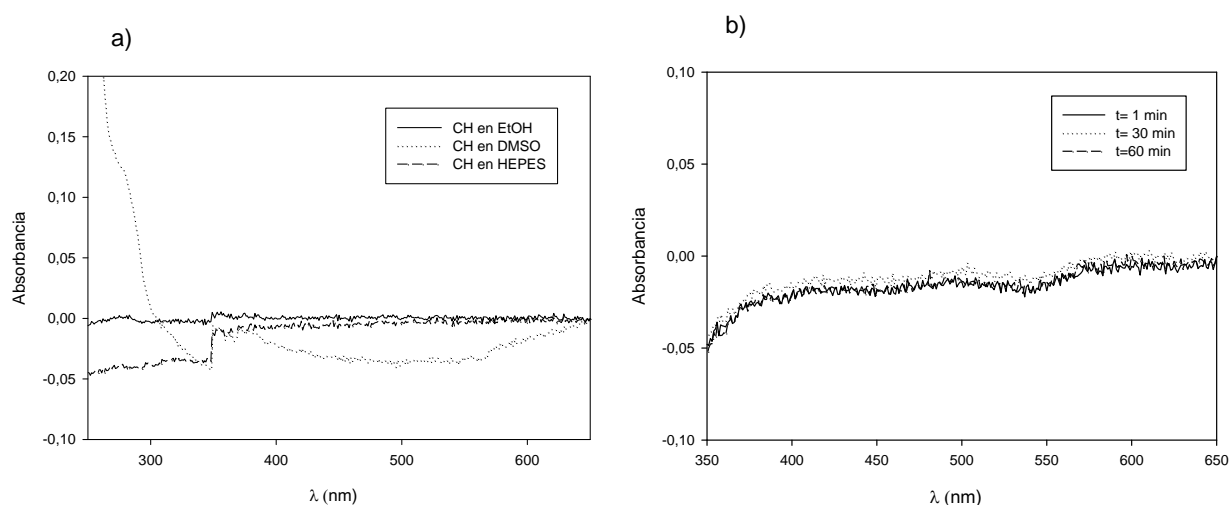


Figura 4.6. Espectro de absorción UV-visible a) CH disuelto en HEPES, EtOH y DMSO T20°C b) CH/HEPES T55°C a diferentes tiempos. La  $[CH]$  fue 2,5  $\mu$ M. Los experimentos se dejaron 1 h y se registró 1 espectro cada 5 min.

Las absorbancias que se van incrementando de manera continua entre los 400-500 nm a medida que pasa el tiempo, son debidas a la autooxidación que sufre la catequina (Nkhili et al., 2014), por ello cuando la concentración de CH es 2,5 mM se observan claramente los picos de absorbancias, y cuando es 0,25 mM al principio sale un espectro plano, pero al cabo del tiempo empieza a absorber de nuevo en la franja de 400-500 nm (Figuras 4.4 y 4.5) y a una concentración de 2,5  $\mu$ M conseguimos que no se observen estos picos (Figura 4.6). Cuando trabajamos con rodopsina, utilizamos una concentración 10 veces más pequeña ( $[CH]= 2,5$   $\mu$ M) por lo que podemos menospreciar la absorbancia debida al CH frente a la de la rodopsina a 500 nm.

#### 4.1.3. Estabilidad térmica de la rodopsina en presencia de CH

En la figura 4.7, se muestran los espectros UV-visible de la rodopsina junto con el CH disuelto en HEPES 100 mM pH 7,4 (contiene 0,05% DM). Los espectros se realizaron a 55°C, programando al espectrofotómetro para registrar durante 1h 1 ciclo por minuto.

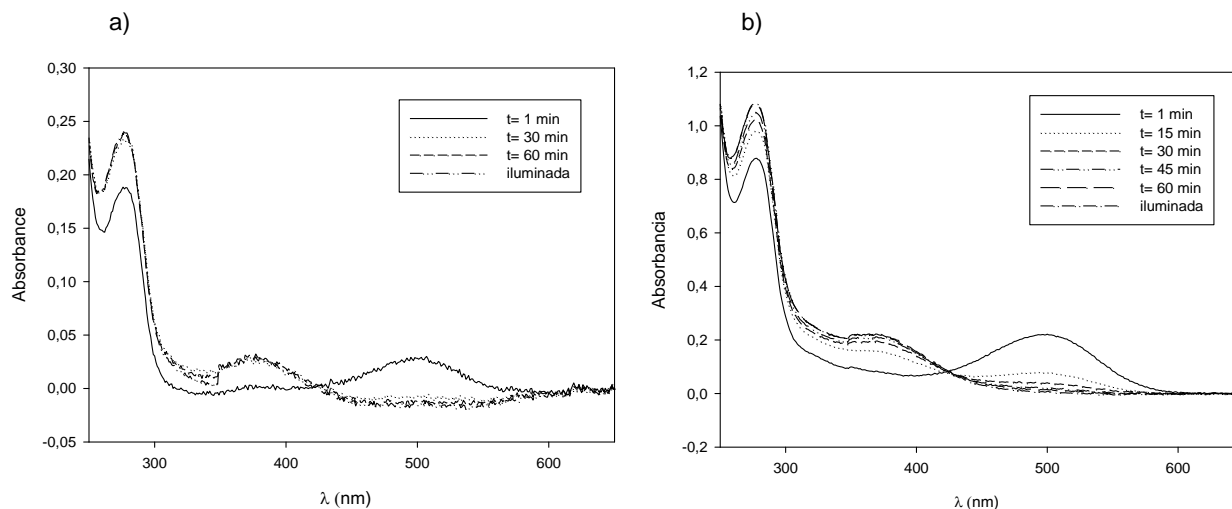


Figura 4.7. Espectro de absorción UV-visible a 55°C. Rodopsina solubilizada y CH. a) [CH]= 2,5 mM b) [CH]= 2,5 μM.

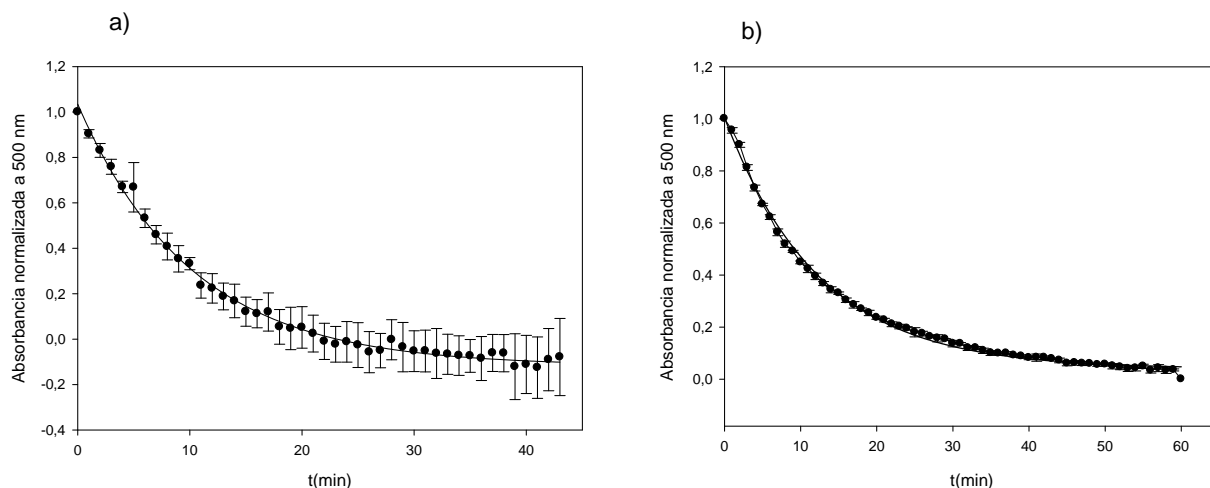


Figura 4.8. Gráfica de  $A_{500}$  media normalizada en función del tiempo. a) [CH]= 2,5 mM. b) [CH]= 2,5 μM.

Obtenemos que el  $t_{1/2}$  es menor cuanto más concentrada esté la disolución. En nuestro caso con una concentración de 2,5 mM el  $t_{1/2}$  es  $6,1 \pm 2$  minutos, cuando bajamos a 2,5 μM incrementa el  $t_{1/2}$  a  $8,5 \pm 1$  minutos (Figura 4.8). También es necesario destacar, que cuando añadimos el CH, el  $t_{1/2}$  se ve disminuido en comparación a cuando tenemos la rodopsina sola. Por lo tanto, podemos decir que el CH provoca que la rodopsina se desnaturalice más rápido y sea más inestable.

$t_{1/2}$ Rossol (min)	$t_{1/2}$ RossolCH 2,5 mM (min)	$t_{1/2}$ RossolCH 2,5 μM (min)
9,3	6	8,7
8,3	6,2	8,5
11	4,4	7,4
$9,5 \pm 2$	$6,1 \pm 2$	$8,5 \pm 1$

Tabla 4.1. Resultados obtenidos del  $t_{1/2}$  de la rodopsina sola y de la rodopsina en presencia de CH a concentraciones de 2,5 mM y 2,5 μM. En la última fila se muestra la media y el error de las tres muestras.

#### 4.1.4. Estabilidad térmica del AC

En este ensayo se realizaron espectros de absorción UV-visible a 20 y 55°C, a diferentes concentraciones de AC (25 mM, 2,5 mM, 0,25 mM y 2,5  $\mu$ M) disuelto en HEPES 100 mM (0,05%DM), EtOH y DMSO. Se programó al aparato durante 1h para hacer 12 barridos, 1 barrido cada 5 minutos.

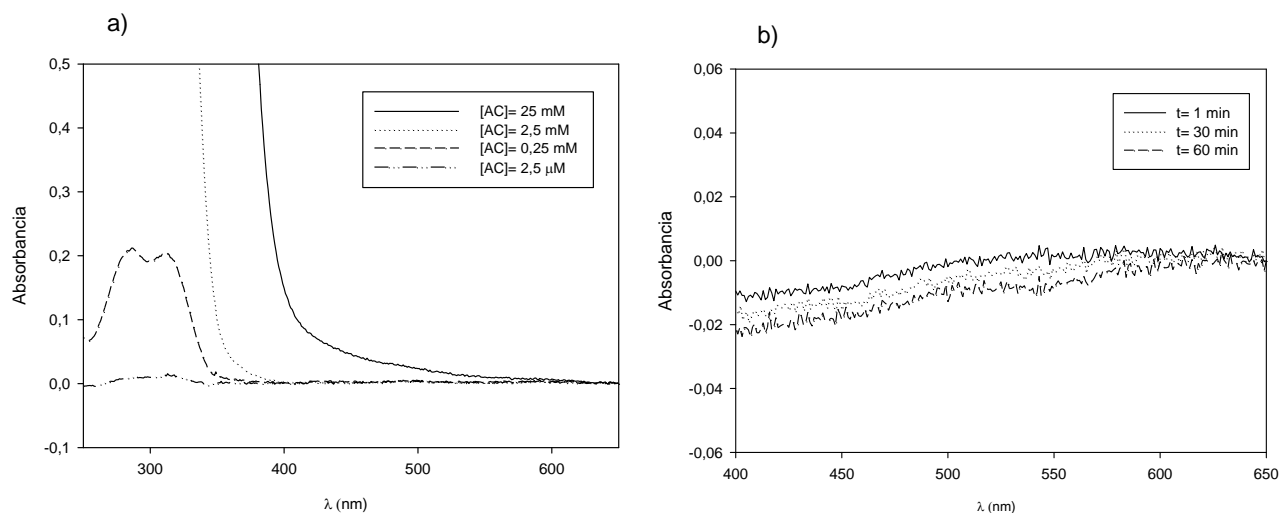


Figura 4.9. Espectros de absorción UV-visible del AC en HEPES 100 mM pH 7,4 0,05% DM. a) [AC]= 25 mM, 2,5 mM, 0,25 mM, 2,5  $\mu$ M a 20°C b) [AC]=2,5  $\mu$ M a 55°C. Se registraron espectros durante 1 h cada 5 minutos.

El AC no mostró ningún pico importante de absorbancia, en el rango del espectro visible, en ninguna de las disoluciones (HEPES, EtOH y DMSO), ni a las diferentes concentraciones (25 mM, 2,5 mM, 0,25 mM y 2,5  $\mu$ M) en las que se realizó el experimento (Figura 4.9). Igualmente realizamos los ensayos a una concentración de 2,5  $\mu$ M para poder hacer un análisis comparativo con la CH.

Sin embargo, sí que se observan dos picos en 285 y 310 nm, que aunque estén fuera de nuestro rango de estudio y no nos afecten a los resultados, parecen deberse a la autooxidación del compuesto (Nkhili et al., 2014).

#### 4.1.5. Estabilidad térmica de la rodopsina en presencia de AC

Para obtener el espectro de absorción UV-visible a 55°C (Figura 4.10), se utilizó una concentración de AC 2,5  $\mu\text{M}$  disuelta en HEPES 100 mM pH 7,4 con 0,05% DM. Iniciamos el programa para que registrara 60 ciclos, uno cada minuto.

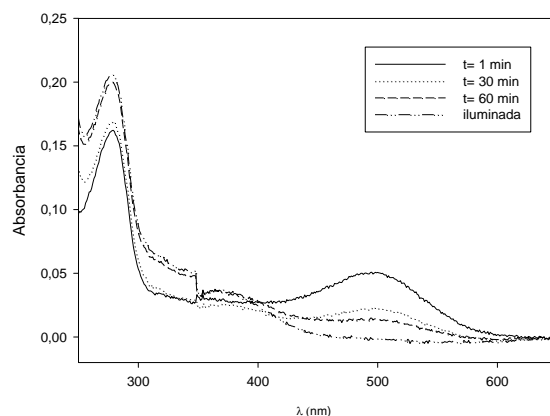


Figura 4.10. Espectro de absorción UV-visible a 55°C. Rodopsina solubilizada y AC, [AC] = 2,5  $\mu\text{M}$ .

El  $t_{1/2}$  fue de  $36 \pm 8$  minutos. Al obtener este resultado se hicieron ensayos con rodopsina sola para saber si era por la rodopsina o era el efecto que ejercía el AC sobre la rodopsina. El  $t_{1/2}$  de la rodopsina sola fue de  $31 \pm 7$  minutos, este tiempo es diferente al que se observó en los primeros experimentos y la diferencia se ha atribuido al tiempo que llevaba preparada la rodopsina solubilizada conservándola a  $-20^\circ\text{C}$ , por eso siempre hemos realizado en el mismo día un experimento de la rodopsina sola y otro con el compuesto fenólico. Podemos decir que el AC aumenta el  $t_{1/2}$  de la rodopsina, por lo que la hace más estable y permanece por más tiempo su absorbancia a 500 nm.

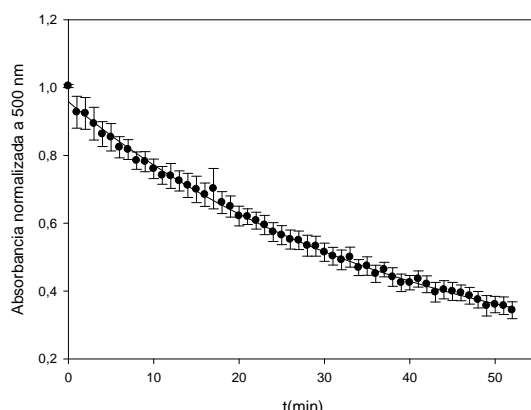


Figura 4.11. Gráfica de  $A_{500}$  media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de cinco muestras.

$t_{1/2}$ Rossol (min)	$t_{1/2}$ RossolAC 2,5 $\mu\text{M}$ (min)
25,6	29
31	30,8
30,4	38
40	38,3
28,8	44,4
$31 \pm 7$	$36 \pm 8$

Tabla 4. 2. Resultados obtenidos del  $t_{1/2}$  de la rodopsina sola y de la rodopsina en presencia de AC 2,5  $\mu\text{M}$ . En la última fila se muestra la media y el error de las cinco muestras.

## 4.2. Regeneración

### 4.2.1. Regeneración de la rodopsina con 9-*cis*-retinal

En la figura 4.12 se muestran los espectros UV-visible de la rodopsina solubilizada en HEPES 100 mM pH 7,4 (0,05% DM) y del 9-*cis*-retinal. Los espectros se realizaron a 20°C y se programó el espectrofotómetro para que hiciera un barrido cada 5 minutos durante 2h. Se observan picos a 500 nm y 373 nm que pertenecen a la rodopsina y al 9-*cis*-retinal respectivamente (a). Al iluminar la muestra la  $A_{500}$  desaparece completamente, pero a medida que pasa el tiempo va incrementando, es decir la rodopsina se está regenerando gracias a la acción del 9-*cis*-retinal, y por lo contrario hay una disminución de la  $A_{373}$  del 9-*cis*-retinal (b).

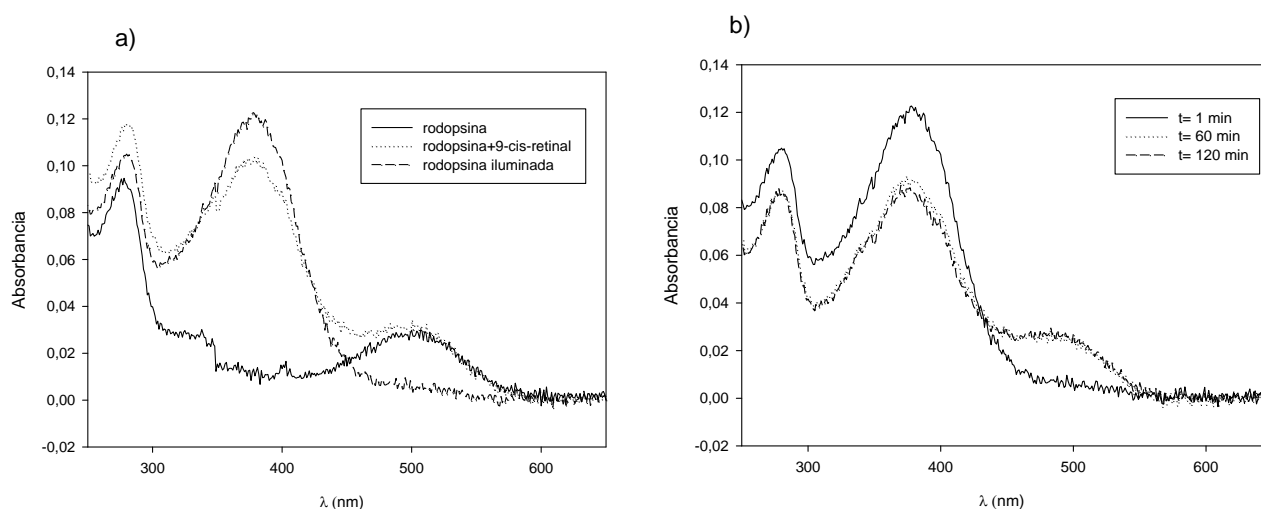


Figura 4.12. Espectro de absorción UV-visible a 20°C. a) Rodopsina solubilizada, 9-*cis*-retinal, y rodopsina iluminada b) Regeneración de la rodopsina solubilizada con 9-*cis*-retinal. Se realizaron espectros cada 5 minutos durante 2 h.

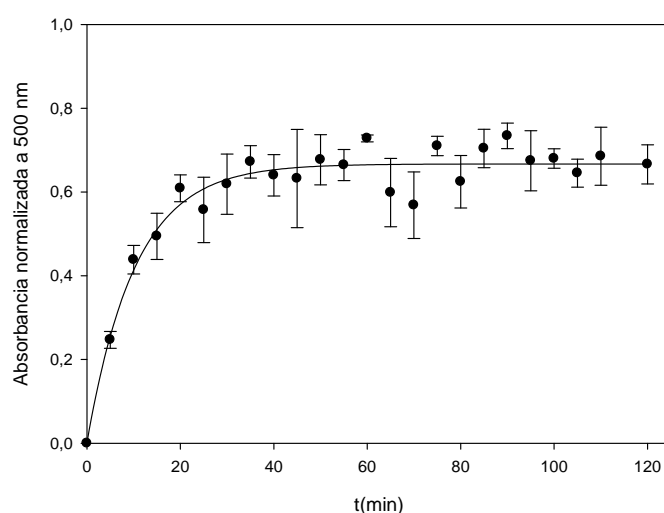


Figura 4.13. Gráfica de  $A_{500}$  media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de tres muestras.



Tenemos el tanto por ciento de regeneración (%REG) que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%REG = \frac{A_{500F} - A_{500DI}}{A_{500AI} - A_{500DI}} \times 100$$

Dónde  $A_{500F}$ , es la absorbancia a 500 nm final;  $A_{500DI}$ , es la absorbancia a 500 nm después de iluminar; y  $A_{500AI}$ , absorbancia a 500 nm antes de iluminar.

Aplicando la ecuación, obtuvimos un resultado del 66,60% de regeneración de la rodopsina. Y el  $t_{1/2}$  fue  $7,4 \pm 2$  min. El 9-*cis*-retinal, no consiguió regenerar completamente la rodopsina.

#### 4.2.2. Interacción entre CH y 9-*cis*-retinal

Se realizaron espectros UV-visible a 20°C de: CH 2,5  $\mu$ M disuelto en HEPES 100 mM pH 7,4 (0,05% DM), 9-*cis*-retinal, y un espectro del CH 2,5  $\mu$ M /HEPES junto con el 9-*cis*-retinal (52,2  $\mu$ M). El aparato se programó durante dos horas para que hiciese 24 ciclos, uno cada 5 minutos (Figura 4.14).

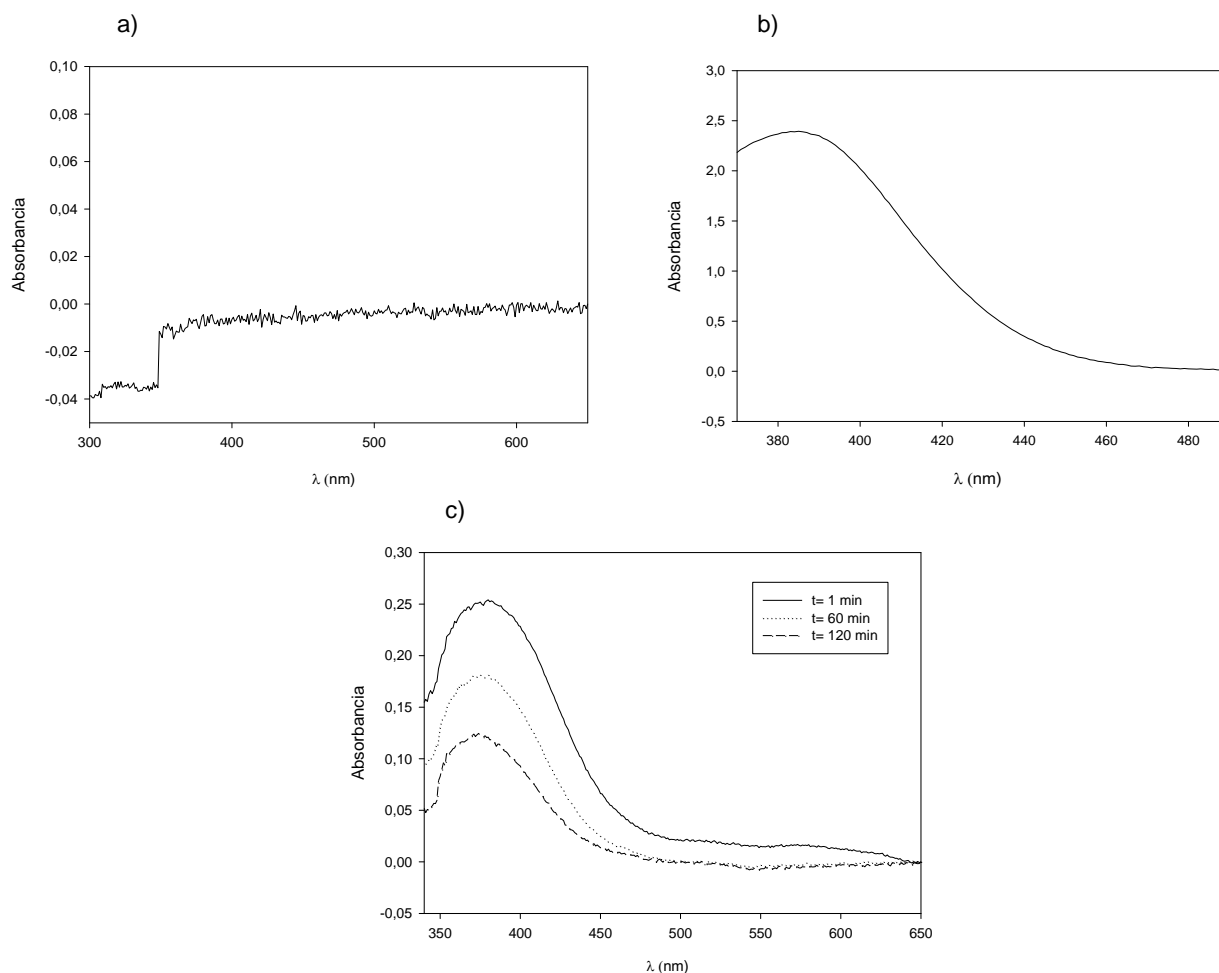


Figura 4.14. Espectro de absorción UV-visible a 20°C. a) Espectro CH/HEPES. [CH]= 2,5  $\mu$ M b) Espectro 9-*cis*-retinal c) Espectro CH+9-*cis*-retinal a diferentes tiempos.

Cuando el 9-*cis*-retinal está junto con la CH, se observa una disminución de la  $A_{373}$  característica del 9-*cis*-retinal. Pero esto no es debido a la CH, si no que el 9-*cis*-retinal va disminuyendo su absorbancia a medida que pasa el tiempo por estar a una temperatura de 20°C durante 2h. Este compuesto lo tenemos a -80°C para que se conserve, por lo que este comportamiento se puede considerar dentro de la normalidad. También se puede notar un desplazamiento de la absorbancia, en el minuto 0 tiene un pico a 379 nm, pasada una hora está a 370 nm que ya se acerca más a 373 nm que es dónde absorbe el 9-*cis*-retinal, y se mantiene así hasta las dos horas.

### 4.2.3. Regeneración de la rodopsina con 9-*cis*-retinal en presencia de CH

Los espectros UV-visible de la rodopsina con CH disuelto en HEPES 100 mM pH 7,4 (0,05%DM) a una concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  a 20°C. Se realizaron 24 ciclos, registrando uno cada 5 minutos (Figura 4.15).

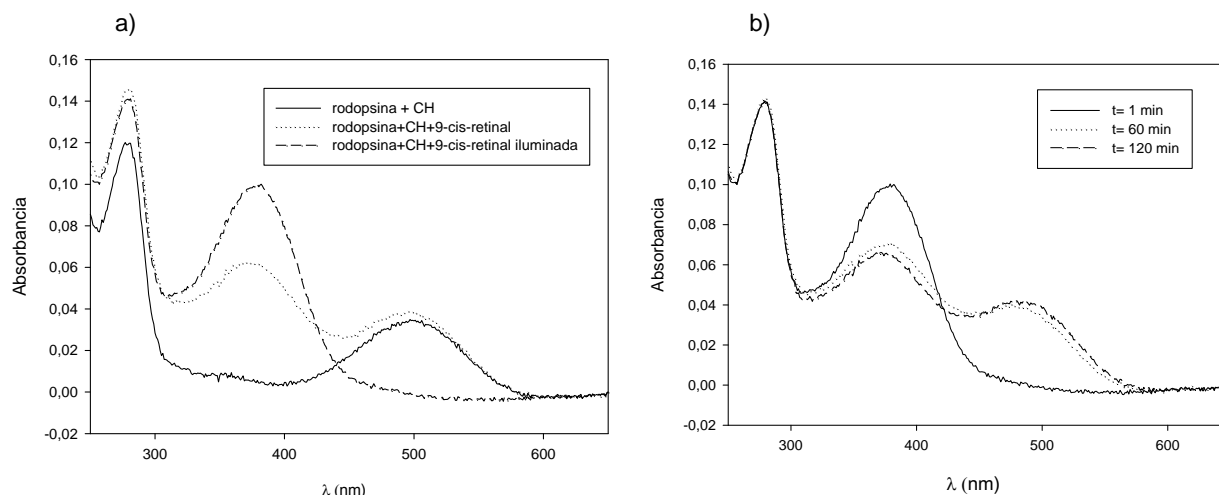


Figura 4.15. Espectro de absorción UV-visible a 20°C. a) Rodopsina con CH, rodopsina con CH y 9-*cis*-retinal, y rodopsina con CH y 9-*cis*-retinal iluminada b) Regeneración de la rodopsina con 9-*cis*-retinal en presencia de CH. [CH]= 2,5  $\mu\text{M}$ . Se realizaron espectros cada 5 min.

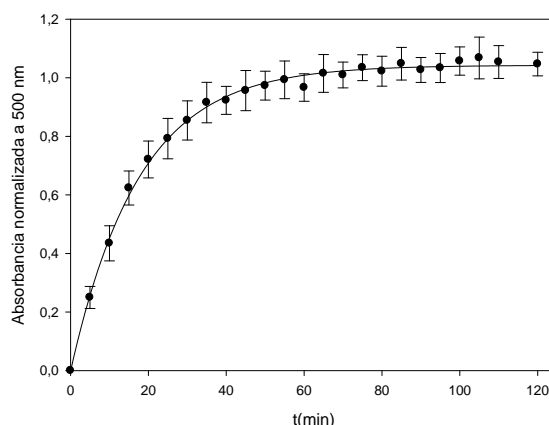


Figura 4.16. Gráfica de  $A_{500}$  media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de tres muestras.

Como se ha comentado en el apartado 4.2.1, cuando la rodopsina interactúa sola con el 9-*cis*-retinal, obtenemos una media del %REG del 66,60%. Al añadir el CH nos da como resultado un 100% de regeneración, por lo que podríamos decir que el CH ayuda a la rodopsina a regenerarse en su totalidad. Por otro lado, el  $t_{1/2}$  daba  $7,4 \pm 2$  minutos cuando la rodopsina estaba sola y  $11,5 \pm 3$  minutos cuando añadíamos el CH, es decir, al estar la rodopsina en contacto con el CH, la regeneración va un poco más lenta, pero va aumentando de manera estable hasta alcanzar el 100% (Figura 4.16).

$t_{1/2}$ Rossol (min)	$t_{1/2}$ RossolCH 2,5 $\mu\text{M}$ (min)	%REG Rossol	%REG RossolCH 2,5 $\mu\text{M}$
6,8	9,9	57,8	100
9	10	73,7	100
6,6	14,8	68,2	100
$7,4 \pm 2$	$11,5 \pm 3$	66,60	100

Tabla 4.3. Resultados obtenidos del  $t_{1/2}$  y del % de regeneración de la rodopsina sola y de la rodopsina en presencia de CH 2,5  $\mu\text{M}$ . En la última fila se muestra la media y el error de las tres muestras.

#### 4.2.4. Interacción entre AC y 9-*cis*-retinal

Se realizaron espectros UV-visible a 20°C de: AC 2,5  $\mu\text{M}$  disuelto en HEPES 100 mM pH 7,4 (0,05% DM), 9-*cis*-retinal, y un espectro del AC 2,5  $\mu\text{M}$  /HEPES junto con el 9-*cis*-retinal (52,2  $\mu\text{M}$ ). El aparato se programó durante dos horas para que hiciese 24 ciclos, uno cada 5 minutos (Figura 4.17).

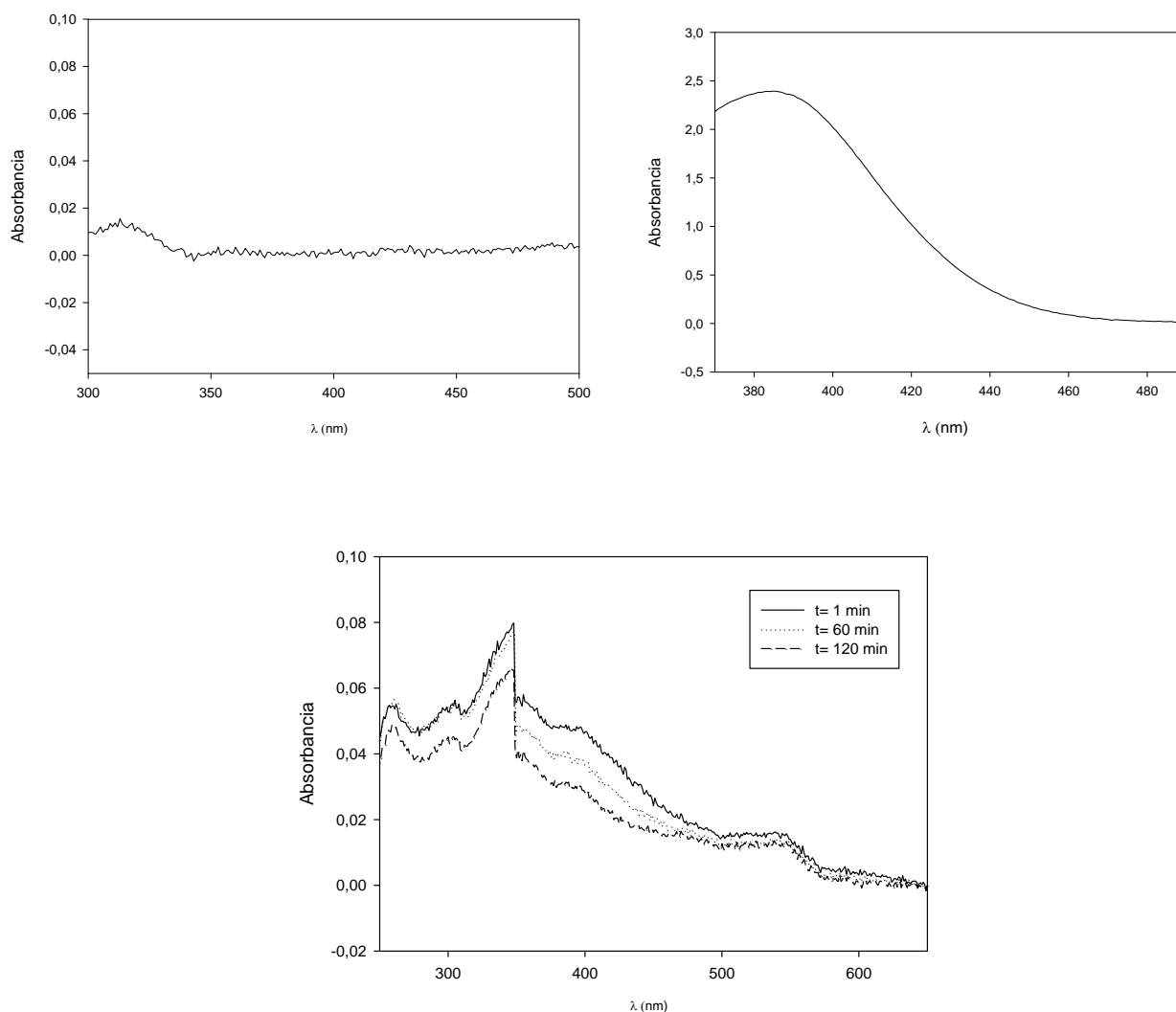


Figura 4.17. Espectro de absorción UV-visible a 20°C. a) Espectro AC/HEPES [AC]= 2,5  $\mu\text{M}$  b) Espectro 9-*cis*-retinal c) Espectro AC+9-*cis*-retinal a diferentes tiempos.

Aparte de las dos bandas características del AC a 285 y 310 nm que ya comentamos en el apartado 4.1.4. observamos otro pico alrededor de 390 nm, ésta absorbancia es debida a la autooxidación del ácido cafeico que se desarrolla lentamente durante 2h (Nkhili et al., 2014). Por esta autooxidación del AC, la absorbancia del 9-*cis*-retinal a 373 nm se ve alterada (Figura 4.17).

#### 4.2.5. Regeneración de la rodopsina con 9-*cis*-retinal en presencia de AC

Los espectros UV-visible de la rodopsina con AC disuelto en HEPES 100 mM pH 7,4 (0,05%DM) a una concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  a 20°C. Se realizaron 24 ciclos, registrando uno cada 5 minutos (Figura 4.18).

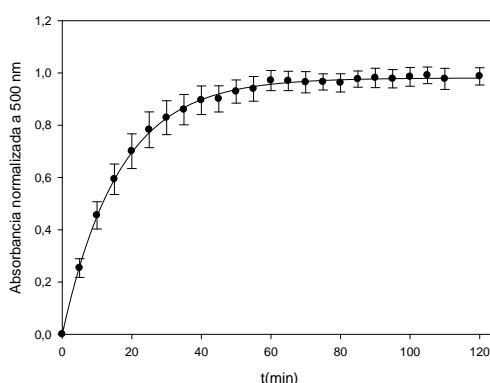
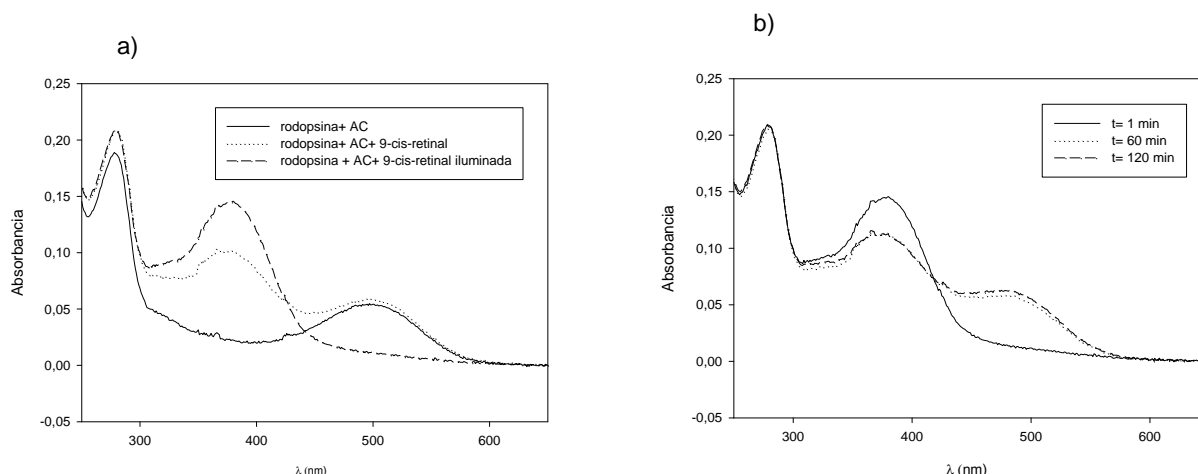


Figura 4.19. Gráfica de  $A_{500}$  media normalizada en función del tiempo. Se realizó la media de tres muestras.

Con el AC, obtenemos un % de regeneración del 97,5% y un  $t_{1/2}$  de  $11,06 \pm 2$  minutos (Figura 4.19). Estos resultados nos indican que el AC consigue regenerar casi completamente a la rodopsina, aunque como en el caso de la CH, lo hace también más despacio, pero de manera continua y constante.

En el apartado anterior, se comentó la autooxidación del AC que tenía lugar alrededor de 390 nm a las dos horas. Este ensayo de regeneración dura dos horas, pero sin embargo no se observan picos adicionales que nos muestren dicha oxidación. Se podría decir que la rodopsina quizá hace el proceso de oxidación del AC vaya todavía más lentamente o incluso evitarlo, pero son solo especulaciones, ya que no está del todo demostrado en este estudio con total seguridad.

$t_{1/2}$ Rossol (min)	$t_{1/2}$ RossolAC 2,5 $\mu\text{M}$ (min)	%REG Rossol	%REG RossolAC 2,5 $\mu\text{M}$
6,8	9,2	57,8	100
9	10,2	73,7	100
6,6	14	68,2	92,5
$7,4 \pm 2$	$11,06 \pm 2$	66,60	97,5

Tabla 4.4. Resultados obtenidos del  $t_{1/2}$  y del % de regeneración de la rodopsina sola y de la rodopsina en presencia de AC 2,5  $\mu\text{M}$ . En la última fila se muestra la media y el error de las tres muestras.

### 4.3. Acidificación

#### 4.3.1. Acidificación de la rodopsina

Con una muestra de rodopsina solubilizada en HEPES 100 mM pH 7,4 que contiene 0,05% DM, programamos para hacer un espectro UV-visible en presencia y en ausencia de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Figura 4.20).

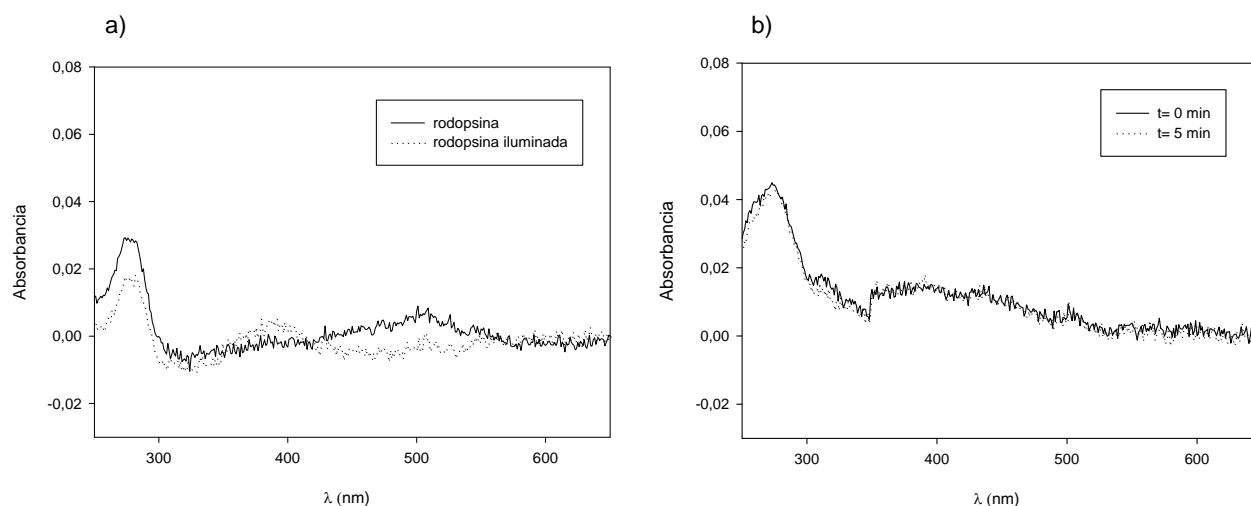


Figura 4.20. a) Espectro de la rodopsina solubilizada y posteriormente iluminada con filtro amarillo b) Acidificación de la rodopsina con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N a diferentes tiempos.

La figura 4.20 muestra, que cuando iluminamos la rodopsina, su pico de absorción a 500 nm desaparece y se desplaza a 380 nm aproximadamente que pertenece a la Meta II. Al añadir  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N con un pH de 2 inmediatamente después de blanquear la rodopsina, aparece un pico a 440 nm que es el que nos indica la presencia de la base de Schiff protonada en el estadio de la Meta II (Janz et al., 2003). A los 5 minutos se vuelve hacer otro espectro, pero no se observan diferencias respecto al barrido realizado a los 0 minutos.

### 4.3.2. Acidificación de la rodopsina en presencia de CH

Para obtener los espectros UV-visible de la figura 4.21, se realizó un barrido de la rodopsina solubilizada con CH 2,5  $\mu$ M disuelto en HEPES 100 mM pH 7,4 con 0,05% DM y posteriormente iluminada con filtro amarillo ( $\lambda > 495$  nm). Acidificamos con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y hacemos un barrido a los 0 y 5 minutos.

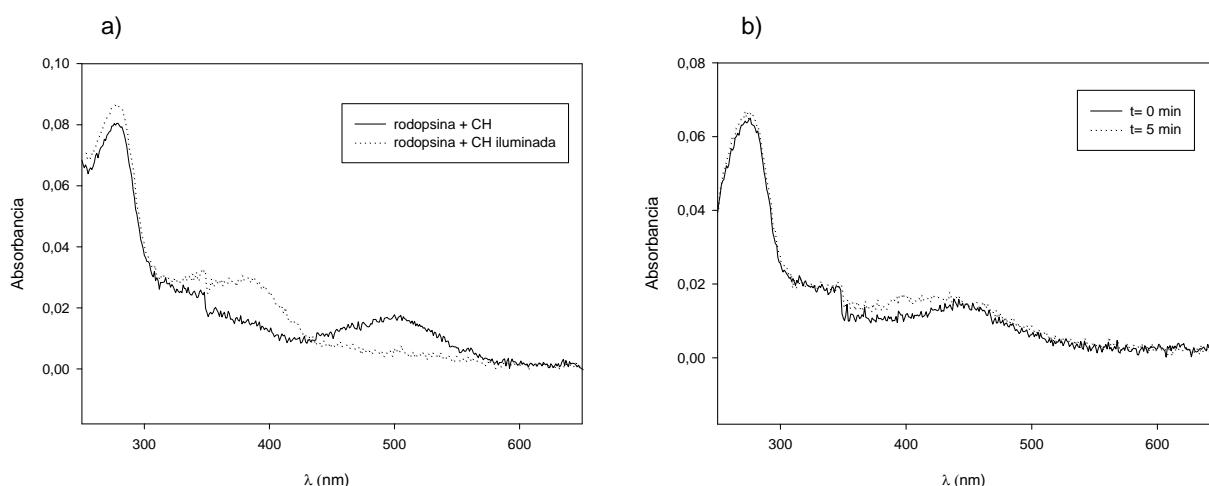


Figura 4.21. a) Espectro rodopsina solubilizada con  $[\text{CH}] = 2,5 \mu\text{M}$  y posteriormente iluminada con filtro amarillo b) Acidificación de la rodopsina en presencia de  $[\text{CH}] = 2,5 \mu\text{M}$  con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Se realizó espectro inicial y a los 5 min.

En vista de lo comentado en el apartado anterior, en presencia de CH se pronuncia más el pico a 440 nm. En el espectro realizado a los 5 minutos, se puede apreciar un pequeño desplazamiento de la absorbancia a 400 nm (Figura 4.21) por lo que es posible que la CH colabore en la reprotonación de la base de Schiff.

### 4.3.3. Acidificación de la rodopsina en presencia de AC

En los espectros UV-visible de la figura 4.22, se puede observar que se realizó un barrido de la rodopsina solubilizada con AC 2,5  $\mu\text{M}$  disuelto en HEPES 100 mM pH 7,4 con 0,05% DM y otro justo después de ser iluminada con filtro amarillo ( $\lambda > 495\text{nm}$ ). Acidificamos con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y hacemos un barrido a los 0 y 5 minutos.

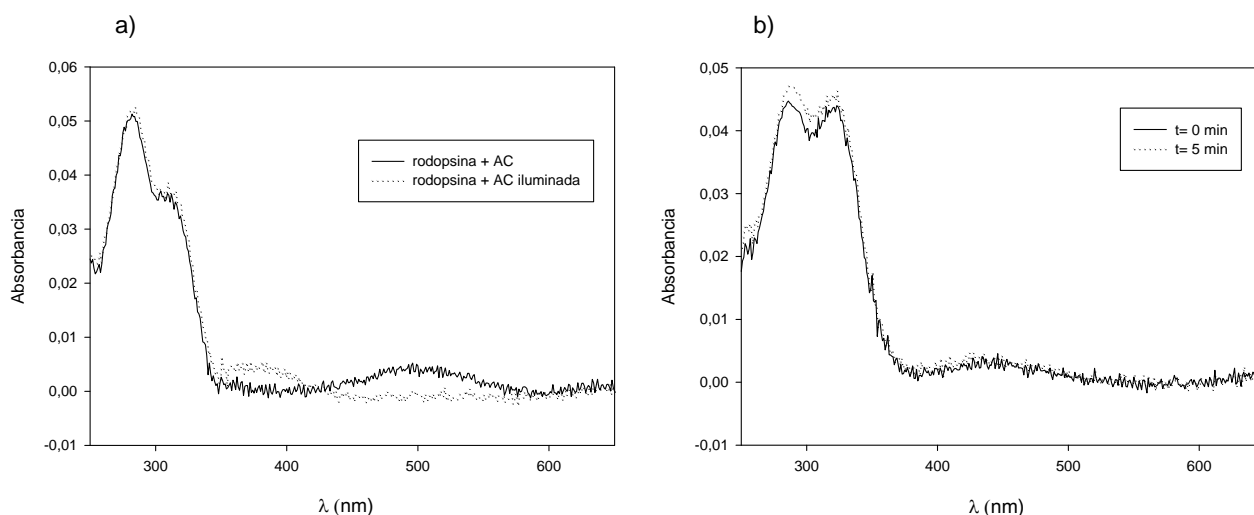


Figura 4.22. a) Espectro rodopsina solubilizada con  $[\text{AC}] = 2,5 \mu\text{M}$  y posteriormente iluminada con filtro amarillo  $\lambda > 495\text{nm}$  b) Acidificación de la rodopsina en presencia de  $[\text{AC}] = 2,5 \mu\text{M}$  con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Se realizó espectro inicial y a los 5 min.

En este caso, igual que en la rodopsina sola, no se observa ningún cambio en el desplazamiento de la base de Schiff pasados los 5 minutos del primer barrido en presencia de AC, pero sí que está el pico a 440 nm perteneciente a la protonación de la base de Schiff.

Puesto que no hay diferencias significativas al acidificar las muestras en ausencia o en presencia de estos compuestos fenólicos deducimos que no debe haber cambios conformacionales relevantes en el entorno de la base de Schiff.



## 5. CONCLUSIONES

En este proyecto se demuestra como la rodopsina en presencia de un ácido fenólico como es el ácido cafeico, mejora su estabilidad térmica haciendo que la proteína no se desnaturalice tan rápido como cuando se encuentra en ausencia de este compuesto. Además, la presencia de un flavonoide como la catequina, ayuda a que la rodopsina se regenere en su totalidad después de haber sido blanqueada.

También hemos podido observar particularidades de los compuestos fenólicos con los que hemos trabajado, como la autooxidación de la catequina y del ácido cafeico.

En los experimentos de estabilidad térmica con el ácido cafeico 2,5  $\mu\text{M}$  el  $t_{1/2}$  fue de  $36 \pm 8$  minutos, mientras que, la rodopsina en ausencia de éste presenta un  $t_{1/2}$  de  $31 \pm 7$  minutos. Se puede decir que cuando la rodopsina interacciona con el ácido cafeico, mantiene su estructura por más tiempo, ya que se puede observar como su absorbancia a 500 nm disminuye más lentamente que en ausencia del ácido cafeico. En cambio con la catequina pasa lo contrario, la rodopsina se blanquea más rápidamente.

En los ensayos de regeneración la rodopsina con 9-*cis*-retinal se regeneró un 66,60% con un  $t_{1/2}$  de  $7,4 \pm 2$  minutos. En presencia de catequina 2,5  $\mu\text{M}$  llegó al 100% de regeneración con un  $t_{1/2}$  de  $11,5 \pm 3$  minutos y junto con ácido cafeico 2,5  $\mu\text{M}$  se obtuvo un 97,5% de regeneración y el  $t_{1/2}$  fue de  $11,4 \pm 2$  minutos. Claramente la presencia de los compuestos fenólicos estudiados, catequina y ácido cafeico, juega un importante papel en la regeneración total de la rodopsina, aunque ambos la regeneran completamente, el proceso es más lento que con rodopsina sola.

Estos compuestos podrían incluirse dentro de nuestra dieta diaria, como elementos preventivos frente a posibles patologías retinianas que se puedan desarrollar en un futuro; y se podrían utilizar terapéuticamente para futuros tratamientos de patologías de la retina como por ejemplo la DMAE o la ceguera nocturna. Se necesitan estudios adicionales para confirmar el efecto estabilizador que hemos encontrado y para descartar cualquier efecto adverso, así como también para la posible extrapolación *in vivo* de estos resultados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alshatwi, A. A., Hasan, T. N., Alqahtani, A. M., Syed, N. A., Shafi, G., Al-Assaf, A. H., Al-Khalifa, A. S. (2014). Delineating the anti-cytotoxic and anti-genotoxic potentials of catechin hydrate against cadmium toxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental toxicology and pharmacology*. 38, 653-662.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A. y Rodríguez, E. (2004). Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propoleos Argentino. *Acta Farm Bonaerense* 23(3) 369-372.
- Fernández, G. (2014). Academia Minas. <http://www.quimicaorganica.org/iquienes-somos.html>
- Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Ofarm. Ámbito farmacéutico. Nutrición* 23(6) 80-84.
- Hanneken, A., Lin, F. F., Johnson, J. and Maher, P. (2006). Flavonoids Protect Human Retinal Pigment Epithelial Cells from Oxidative-Stress-Induced Death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(7) 3164-3177.
- Hill, R. W., Gordon, A. Wyse, Anderson (2004). Fisiología animal. *Ed. Médica Panamericana*. 422
- Janz, J. M., Farrens, D. L. (2003). Assessing structural elements that influence Schiff base stability: mutants E113Q and D190N destabilize rhodopsin through different mechanisms. *Vision Research* 43 2991-3002.
- Kim, J. H., Lee, B. J., Kim, J. H., Yu, Y.S, Kim, K.W. (2009). Anti-angiogenic effect of caffeic acid neovascularization. *Vascular Pharmacology on retinal* 51 262-267.
- Kozłowska, A., Węgierek D. S. (2014). Flavonoids- Food Sources and Health Benefits National Institute of Public Health 65(2) 79-85.
- Manzanas, L., Rodríguez, E., Marcos, A., Cordero, M.Y., Pastor, J.C. (2001). Flavonoides como antioxidantes en solución de irrigación intraocular. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 499-504
- Mar, J. (2012). Física y Química. <http://www.quimicafisica.com/node/147>
- Martínez, A. M. (2005). Flavonoides.
- Martínez, S., González J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17(6) 271-278.
- Martino, V. (2000). Los Flavonoides Como Promisorios Agentes Preventivos y Terapéuticos. *Acta Farnz. Bonaerense* 19(4) 303-308.
- Matias, T., Marques, J., Quina, M. J., Gando, L. F., Valente, A. J. M., Portugal, A., Durães, L. (2015). Silica-based aerogels as adsorbents for phenol-derivative compounds. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1-10.

- Mierziak, J., Kostyn, K., and Kulma, A. (2014). Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules* 19 16240-16265.
- Mojzis, J., Varinska, L., Mojziso, G., Kostova, I., Mirossay, L. (2008) Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacological Research* 57 259-265.
- Nkhili, E., Loonis, M., Mihai, S., Hajji, H. E. and Dangles, O. (2014). Reactivity of food phenols with iron and copper ions: binding, dioxygen activation and oxidation Mechanisms. *Royal Society of Chemistry. Food and Function* 5 1186-1202.
- Pérez, G. T. (2003). Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas* 22(1) 48-57.
- Prado, A. S., Camas, J. T., Sánchez, R. C., Fonseca. (2006). Fototransducción visual. *Rev Mex Oftalmol* 80(6) 340-346.
- Ramón, E., Gómez, J., del Valle, L., Urtubia, C., Götzens, G., Garriga, P. (2002). Estructura tridimensional de la rodopsina. *Ver y Oír* 403-409.
- Ramón, E. (2004). Tesi doctoral (UPC). Estudi de l'efecte de l'entorn i de mutacions en l'estructura i estabilitat del receptor acoblat a proteïna G rodopsina.
- Reyes, A. A., Martínez, M. M., Ramon, E., and Garriga, P. (2011). Salt Effects on the Conformational Stability of the Visual G-Protein-Coupled Receptor Rhodopsin. *Biophysical Journal* 101 2798-2806.
- Rhone, M. and Basu, A. (2008). Phytochemicals and age-related eye diseases. *Emerging Science* 66(8) 465-472.
- Riquelme, M. L., Campos, E. M., Cuenca N. (2010). La transducción visual. *Annals d'oftalmologia* 18(3) 130-136.
- Siu, A. W., Lau, M. K., Cheng, J. S., Chow, C. K., Tam, W. C., Li, K. K., Lee, D. K. L., To, T. S. S., To, C. H., Do, C. W. (2008). Glutamate-induced retinal lipid and protein damage: The protective effects of catechin. *Neuroscience Letters* 432 193-197.
- Stefek, M. (2011). Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdisciplinary Toxicology* 4(2) 69-77.
- Urtubia, C. (1999). Neurobiología de la visión. *Edicions UPC*. 83-105
- Urzúa, U. (2009). Cinética química. *Biología Celular y Molecular ICBM-Facultad de Medicina, Chile*.
- Valls, J., Lampreave, M., Nadal, M. y Arola, L. (2000). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentación: equipos y tecnología* 119-124.
- Yao, K., Zhang, L., Zhang, Y., Ye, P., Zhu, N. (2008). The flavonoid, fisetin, inhibits UV radiation-induced oxidative stress and the activation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling in human lens epithelial cells. *Molecular Vision* 14 1865-1871.

## 7. ANEXOS

### 7.1. ANEXO 1: Espectros UV-visible de la catequina

En la figura 1, se muestran los espectros de absorción UV-visible de la disolución de HEPES 100 mM pH 7,4 (0.05% DM) con EtOH y con DMSO a 20°C.

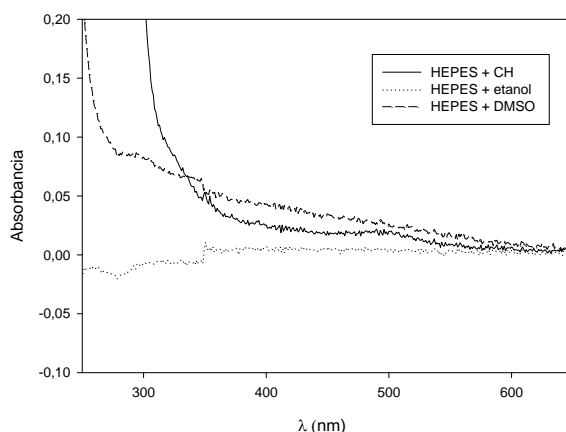


Figura 1. Espectro UV-visible a 20°C de la disolución de HEPES 100 mM pH 7,4 que contiene 0,05% DM, junto con EtOH y DMSO.

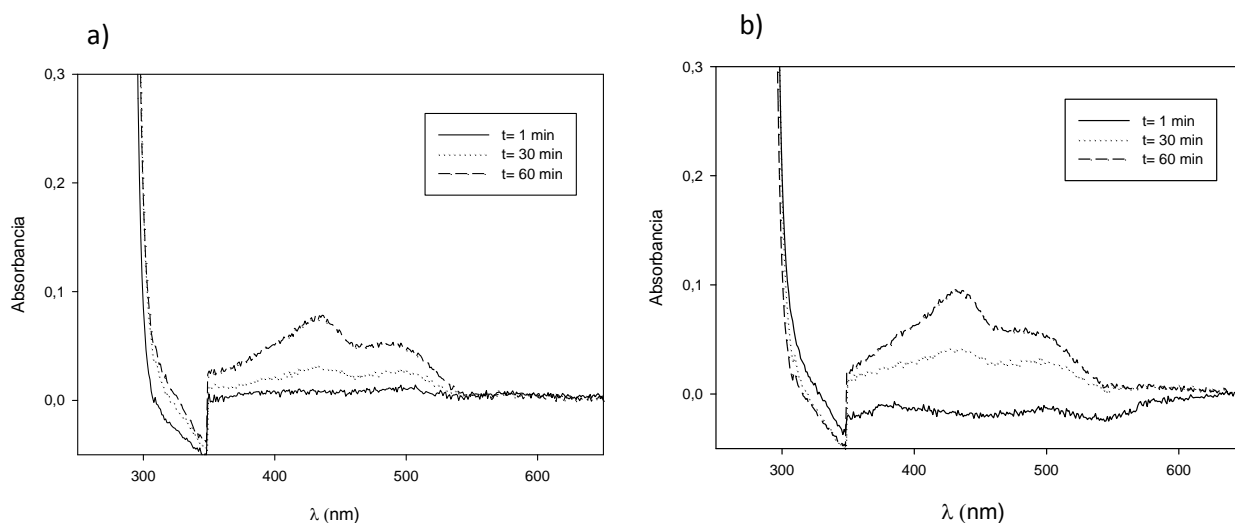


Figura 2. Espectros UV-visible a 55°C a) CH/EtOH; b) CH/DMSO. La [CH] fue 2,5 mM. Los experimentos se dejaron 1 h y se registró 1 espectro cada 5 min.

Se realizan espectros UV-visible de CH 2,5 mM disuelto en EtOH (Figura 1.a) y en DMSO (b) para comprobar la autooxidación de la CH en diferentes disolventes. Se observa que en los tres casos la CH se acaba oxidando.

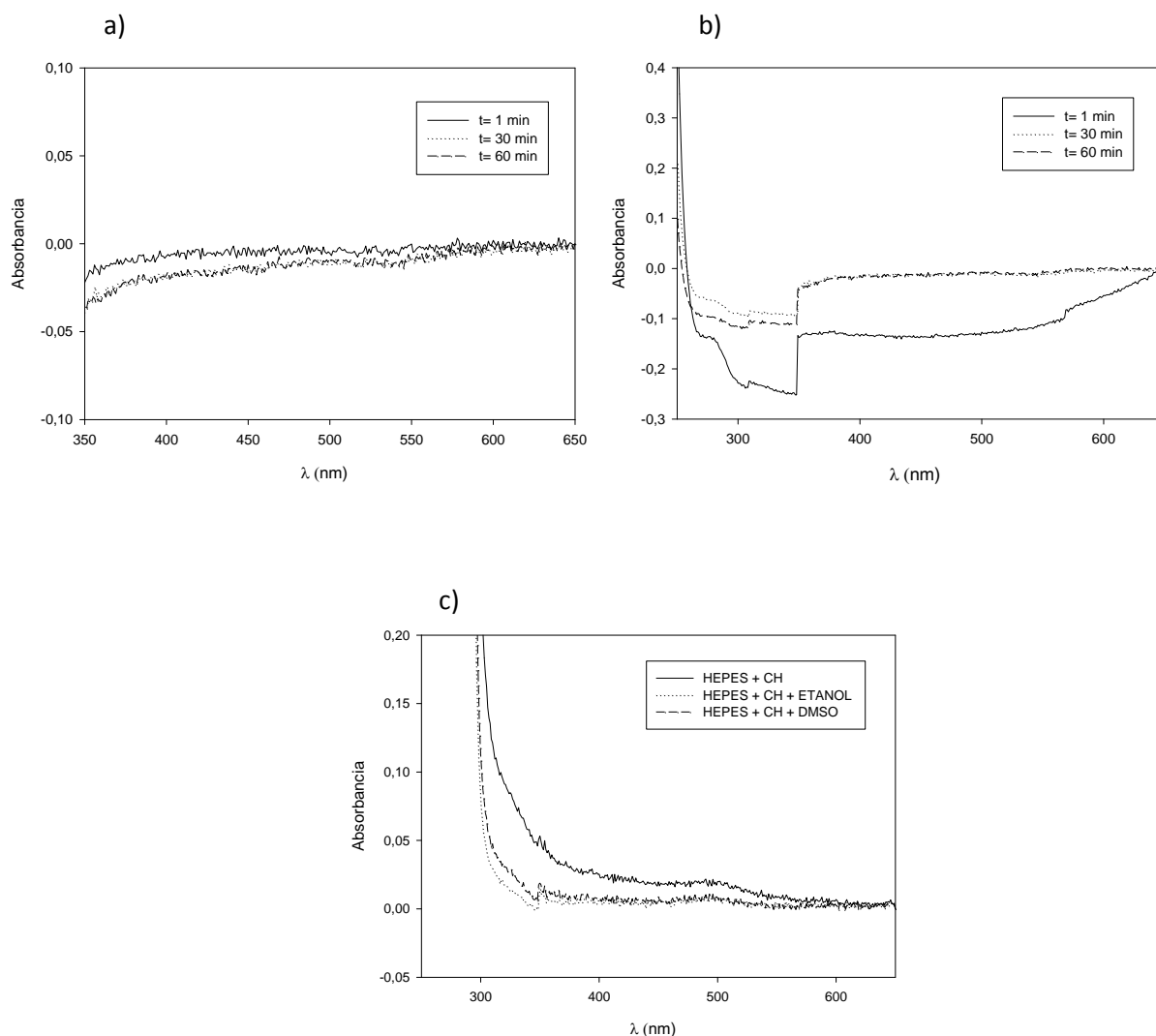


Figura 3. Espectro de absorción UV-visible a) CH/EtOH T55°C b) CH/DMSO T55°C c) CH disuelto en HEPES, EtOH y DMSO a 20°C. La [CH] fue 2,5  $\mu\text{M}$ . Los experimentos se dejaron 1 h y se registró 1 espectro cada 5 min.

Se registraron espectros UV-visible a una temperatura de 55 y 20°C (Figura 3) de CH 2,5  $\mu\text{M}$  disuelto en tres disolventes diferentes: HEPES 100 mM pH 7,4 (0.05% DM), EtOH y DMSO. A una temperatura de 20°C (c) se puede observar una pequeña absorbancia a 500 nm, debido a la autooxidación que sufre el CH.

## 7.2. ANEXO 2: Espectros UV-visible del ácido cafeico disuelto en EtOH y DMSO a diferentes concentraciones.

La figura 4 muestra los espectros UV-visible a 20°C del AC disuelto en EtOH (b) y en DMSO (b) a concentraciones de 25 mM, 2,5 mM, 0,25 mM y 2,5  $\mu$ M. Acto seguido, se aumento la temperatura a 55°C y se programó al espectrofotómetro para registrar 12 ciclos, 1 cada 5 minutos del AC 2,5  $\mu$ M disuelto en EtOH y DMSO (Figura 5).

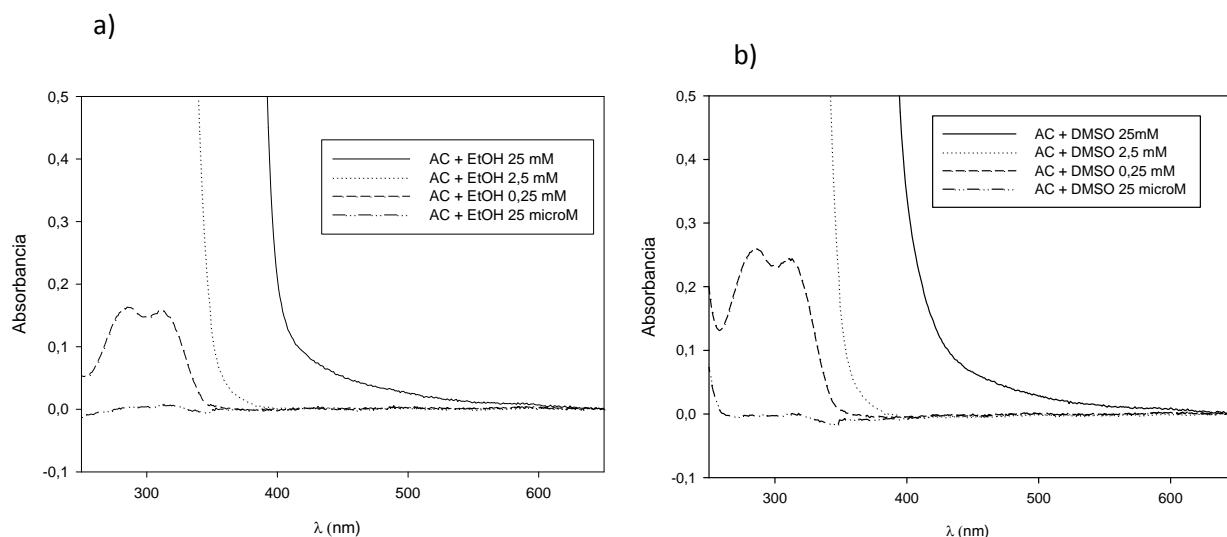


Figura 4. Espectro UV-visible a 20°C. a) AC/EtOH b) AC/DMSO. Las [AC] fueron de 25 mM, 2,5 mM, 0,25 mM y 2,5  $\mu$ M.

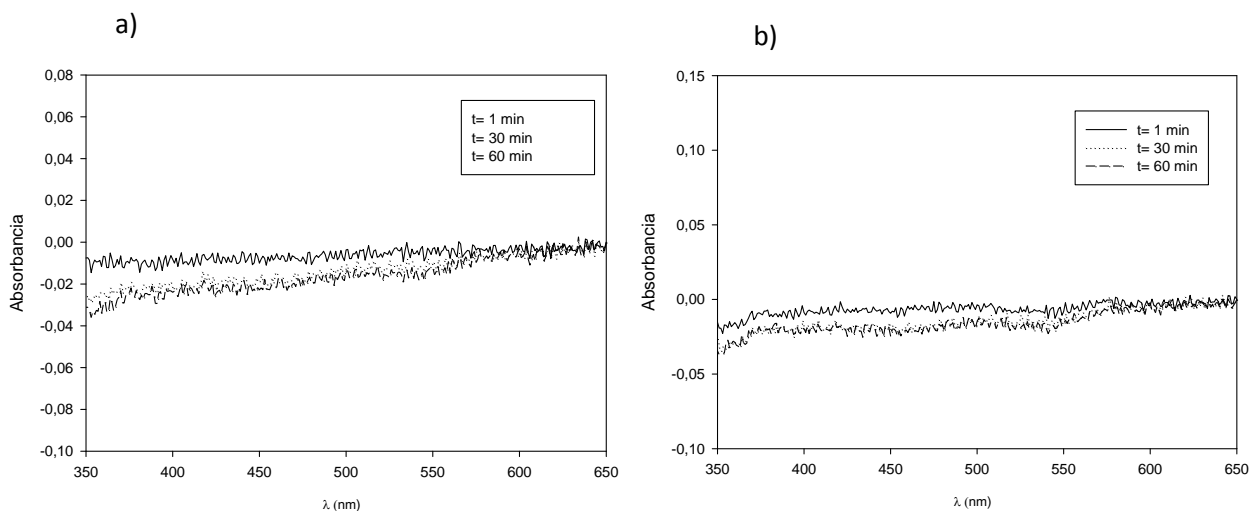


Figura 5. Espectro UV-visible a 55°C. a) AC/EtOH b) AC/DMSO. Las [AC] fue 2,5  $\mu$ M. Se realizó un espectro cada minuto durante 1 h.

El ácido cafeico no muestra absorbancia en el visible a ninguna de las concentraciones estudiadas, ni en ninguno de los disolventes (EtOH y DMSO).

## **8. COMPROMISO ÉTICO Y SOCIAL**

En este trabajo se han cumplido todas las implicaciones éticas y sociales ligadas a la competencia transversal "Compromiso ético y social" introducida en la titulación del Grado en Óptica y Optometría".